

Aus dem Institut für Pathologie
Universitätsklinikum Steglitz der
Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. U. Gross

**TUMORASSOZIIERTE PROTEINE BEIM
LEBERCARCINOM**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

1983

vorgelegt von Eva Härtel aus Weiden

Referent: Prof. Dr. med. U. Gross

Koreferent: Prof. Dr. med. U. Hopf

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 17. Februar 1984

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	6
II.	Fragestellung	9
III.	Material und Methode	10
	1. Primäre Lebercarcinome	10
	2. Immunhistochemie mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode nach Sternberger	10
IV.	Die Morphologie des primären Lebercarcinoms nach der WHO-Klassifikation	12
	1. Das primäre Lebercarcinom	12
	1.1 Das Hepatocelluläre Carcinom	14
	1.2 Das Cholangiocarcinom	16
V.	Eigenschaften der Marker	18
	1. Carcinoembryonales Antigen (CEA)	18
	2. alpha-Fetoprotein (AFP)	19
	3. α_1 -Antitrypsin (α_1 AT)	20
	4. HBs-Antigen (HBsAg)	21
VI.	Resultate	22
VII.	Diskussion	45
	1. CEA-Nachweis	45
	1.1 CEA im Serum	45
	1.2 CEA im histologischen Schnitt	46
	1.2.1 CEA-Nachweis in unterschiedlichen Geweben	46
	1.2.2 Nachweis CEA-positiver Tumorzellen im primären Lebercarcinom	48
	1.2.3 Die %-Verteilung der CEA-positiven Zellen im Tumorgewebe primärer Lebercarcinome	49
	1.2.4 Kombiniertes Auftreten CEA-positiver Tumorzellen mit anderen Antigenen	49

1.2.5	Nachweis CEA-positiver Zellen im nicht tumorösen Lebergewebe bei primären Lebercarcinomen	50
2.	AFP-Nachweis	51
2.1	AFP im Serum	51
2.2	AFP im histologischen Schnitt	54
2.2.1	AFP-Nachweis in unterschiedlichen Geweben	54
2.2.2	Nachweis AFP-positiver Tumorzellen im primären Lebercarcinom	55
2.2.3	Die %-Verteilung der AFP-positiven Zellen im Tumorgewebe primärer Lebercarcinome	56
2.2.4	Kombiniertes Auftreten AFP-positiver Tumorzellen mit anderen Antigen	57
2.2.5	Nachweis AFP-positiver Zellen im nicht tumorösen Lebergewebe bei primären Lebercarcinomen	58
2.2.6	Korrelation zwischen AFP-Nachweis im Lebergewebe und AFP-Serumspiegel	58
2.2.7	Korrelation unterschiedlicher AFP-Serumspiegel mit dem Differenzierungsgrad des primären Lebercarcinom	59
3.	α_1 AT-Nachweis	61
3.1	α_1 AT im Serum	61
3.2	α_1 AT im histologischen Schnitt	62
3.2.1	α_1 AT-Nachweis im Lebergewebe bei α_1 AT-Mangel und in anderen Geweben	62
3.2.2	α_1 AT-Nachweis bei primären Lebercarcinomen in Korrelation zum α_1 AT-Mangel	65
3.2.3	%-Verteilung der α_1 AT-positiven Zellen im Tumorgewebe primärer Lebercarcinome	67

3.2.4	Kombiniertes Auftreten a ₁ AT-positiver Tumorzellen mit anderen Antigenen	68
4.	HBsAg-Nachweis	71
4.1	HBsAg im Serum	71
4.1.1	Korrelation zwischen HBV-Infektion, HBsAg im Serum, Zirrhose und Hepatocellulärem Carcinom	72
4.1.2	Korrelation zwischen HBsAg im Serum und AFP-Serumspiegel	73
4.2	HBsAg im histologischen Schnitt	74
4.2.1	HBsAg-Nachweis bei HBV-Infektion und Hepatocellulärem Carcinom	74
4.2.2	HBsAg-Vorkommen bei Hepatocellulären Carcinomen und bei Kontrollgruppen	76
4.2.3	Vorkommen von HBsAg in Kombination mit Zirrhose	77
4.2.4	%-Verteilung der HBsAg-positiven Zellen im Tumorgewebe von Hepatocellulären Carcinomen	77
4.2.5	Kombiniertes Auftreten HBsAg-positiver Tumorzellen mit anderen Antigenen	77
4.2.6	Nachweis HBsAg-positiver Zellen im nicht tumorösen Lebergewebe bei Hepatocellulären Carcinomen	78
4.2.7	Korrelation des Serum-HBsAg mit dem Gewebe-HBsAg	78
4.2.8	Das Durchschnittsalter der HBsAg-positiven HCC-Fälle	79
VIII.	Zusammenfassung	80
IX.	Verwendete Symbole	83
X.	Literatur	84

I. Einleitung

In den letzten Jahren hat die immunologische Diagnose maligner Tumoren durch den Nachweis von tumorassozierten Antigenen zunehmend an Bedeutung gewonnen und einen erheblichen Fortschritt erfahren (114, 115, 116). Als tumorassozierte Antigene bezeichnet man Antigene maligner Zellen oder Proteine, die in malignen Tumorzellen synthetisiert werden (209).

Bei verschiedenen malignen Tumoren des Menschen fanden sich diese sog. tumorassozierten Antigene, zu denen auch das carcinoembryonale Antigen (CEA) und das alpha-Fetoprotein (AFP) gehören. Diese Antigene bzw. Proteine werden während der intrauterinen Entwicklung von Mensch und auch Tier in der Plazenta oder in fetalen Organen gebildet und sind nach der Geburt nicht mehr oder nur in äußerst geringen Konzentrationen bei gesunden Personen nachweisbar (12, 55, 207). Bei Patienten mit bestimmten malignen Tumoren und einigen nichtmalignen Erkrankungen können diese carcinofetalen Antigene zu einem Konzentrationsanstieg im Serum und auch im Gewebe führen.

Die nosologische Bedeutung des α_1 -Antitrypsin-Mangels (ATM) mit anhaltend verminderter Serum- und Gewebkonzentration liegt in seiner relativ häufigen Verbindung mit einem früh auftretenden primären, panazinären Lungenemphysem der Erwachsenen (85, 86, 216) und einer eigenartigen Hepatopathie der Säuglinge und Kleinkinder, die bereits im Kindes- oder aber erst im Erwachsenenalter zu einer Zirrhose führen kann (28, 110, 337).

Von LAURELL und ERIKSON wurde 1963 das Auftreten eines Lungenemphysems bei ATM im frühen Erwachsenenalter beschrieben (195). GANROT et al (104) berichteten 1967 von zwei Fällen mit Leberzirrhose und einem Fall mit malignen Lebertumor bei erwachsenen Patienten mit ATM, ohne einen Zusammenhang zwischen Leberkrankheiten und ATM zu vermuten. 1969 wurde von SHARP (336) erstmals auf einen Zusammenhang zwischen kindlicher Leberzirrhose bei homozygotem Mangel und ATM aufmerksam gemacht. Erst die Autop-

siestudie von BERG und ERIKSSON 1972 machte auf das Vorkommen von ATM und Leberkrankheiten auch bei Erwachsenen aufmerksam (28).

Lunge und Leber nehmen beim ATM auch nach heutigen Kenntnissen eine Sonderstellung ein (274). Während ein kausalgene-tischer Zusammenhang zwischen ATM und Leberschäden bei Er-wachsenen bis jetzt nur vermutet wird (99, 164, 242), besteht bei Kindern kaum noch ein Zweifel über den Zusammenhang (355, 356). Die geringe Anzahl bekanntgewordener Fälle mit ATM und Lebererkrankungen im Erwachsenenalter, läßt insgesamt auf ein seltenes Vorkommen schließen (164).

Die Inzidenz des ATM ist bei Leberzirrhose und Leberzellcar-cinom nicht höher als bei Vergleichspopulationen (373). Phäno-typische Studien (99, 242, 289) über ATM im Serum zeigen eine nur unbedeutende Zunahme von Z-Allele, die keine statistische Bedeutung erreicht. Im Gegensatz dazu lassen jedoch immuno-zytochemische und histologische Studien auf einen Zusammen-hang mit Leberzirrhose schließen und weisen auch auf ein zu-nehmendes Auftreten von Z-Allele in Fällen von hepatocellulä-rem Carcinom hin (34, 89, 277).

Das geographische Vorkommen von Hepatocellulärem Carcinom (HCC) variiert gewaltig; über eine hohe Inzidenz wird aus Afrika und Asien berichtet (335, 339). In Europa und Nordamerika findet es sich viel seltener (103, 223). Das Rätsel dieser seltsamen Epidemie wird im Zusammenhang von Hepatitis-B-Infektion und HCC gebracht (22, 41, 264, 340, 376), da sich das HBsAg bei 10-20 % der Bevölkerung Asiens (38) und Zentralafrikas (33) findet und nur bei 0,1 bis 1 % der Bevölkerung der USA und Europas (39, 40, 272, 296, 329) auftritt.

Schon in den 40er und 50er Jahren berichteten einige Untersu-cher über den Übergang von Hepatitis zur Zirrhose und zum HCC und legten nahe, daß die virale Hepatitis ätiologisch mit der Entwicklung des HCC in Verbindung gebracht werden kann (266). Zahlreiche publizierte Studien seit 1970 (129, 241, 249, 272, 290, 298, 340, 358, 363, 380) zeigen einen ganz klaren Zusam-menhang zwischen primärem Lebercarzinom und Hepatitis-B-

Infektion. Die Beziehung ist eingeschränkt auf HCC, die mehr als 80 % der primären Lebercarcinome ausmachen. Cholangiocarcinome, die unter den breiten Begriff PLC fallen, sind nicht mit chronischer Hepatitis-B-Infektion assoziiert (135).

Das Hepatitis-B-Virus ist sicherlich nicht der einzige ätiologische Faktor der HCC-Genese. Andere Faktoren wie Alkohol-Leberzirrhose (265, 272), Aflatoxine usw., werden diskutiert (18, 98, 135, 197, 287, 395).

II. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll folgende Frage behandelt werden: Kommen die vier Marker (CEA, AFP, α_1 AT, HBsAg), die in anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes gefunden werden, auch in primären Lebercarcinomen vor? Treten die Marker nur im Lebercarcinom oder auch im nicht tumorösen Lebergewebe auf; nur im nicht tumorösen Lebergewebe oder auch im Lebercarcinom?

In welcher Form des Lebercarcinoms, hepatocellulärem Carcinom oder Cholangiocarcinom, treten sie auf, und ergibt das Auftreten der vier Proteine eine charakteristische Kombination für einen bestimmten Tumor?

III. Material und Methode

1. Primäre Lebercarcinome

Untersucht wurden 82 primäre Lebercarcinome (PLC) aus dem Untersuchungsgut der letzten 15 Jahre (Tab. 1). Die Paraffinblöcke wurden neu durchgesehen und anhand der WHO-Klassifikation reklassifiziert und immunhistochemisch behandelt.

2. Immunhistochemie mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode nach STERNBERGER

Der immunhistochemische Nachweis von CEA, a_1AT , AFP und HBs-Antigen erfolgte nach der Peroxidase-Antiperoxidase-Technik nach STERNBERGER et al (362). Alle Gewebestücke wurden in 4 % Formaldehyd fixiert und routinemäßig in Paraffinwachs eingebettet. Alle Schnitte wurden entparaffiniert, gewaschen und, bis auf die Schnitte zum Nachweis von HBs-Antigen, für 15 Minuten mit einer 0,1 %igen Pronaselösung (Sigma) behandelt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurde eine 1 %ige Perjodsäure für CEA für 10 Minuten und für a_1AT , AFP und HBs-Antigen eine 1 %ige H_2O_2 -Lösung für 50 Minuten appliziert. Durch das Übersichten der Schnitte für 10 Minuten mit normalem Schweineserum (DAKO, Dänemark) in einer Verdünnung von 1 : 20, konnte die unspezifische Hintergrundfärbung reduziert werden. Nach dieser Vorbehandlung folgte die Inkubation von 60 Minuten mit Kaninchen-Anti-CEA-Antiserum (DAKO), Verdünnung 1 : 150, bzw. mit Anti- a_1AT -Antiserum (Boehringer), Verdünnung 1 : 1000, mit Anti-AFP-Antiserum (DAKO), Verdünnung 1 : 100, und mit Anti-HBs-Antiserum (Boehringer), Verdünnung 1 : 150. Bei nicht eindeutigem Resultat haben wir den Vorgang mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden wiederholt. "Unspezifisches, kreuzreagierendes Antigen" (NCA) des Anti-CEA-Serums konnte durch die Inkubation mit normalem

humanen Milz- und Lungengewebe ausgeschaltet werden. Nach dieser Absorption waren die Granulozyten und Makrophagen nicht mehr positiv.

Die Schnitte wurden dann für 30 Minuten mit einem Schweine-Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum (DAKO), Verdünnung 1 : 40, behandelt. Darauf folgte, ebenfalls für 30 Minuten, das Kaninchen-Peroxidase-Antiperoxidase-Antiserum (PAP-Komplex, DAKO) in einer Verdünnung von 1 : 40. Alle Antiseren wurden bei Raumtemperatur verwendet. Zwischen jeder Behandlungsstufe wurde in PBS gewaschen, pH 7.6, 3 x 5 Minuten. Der Nachweis der gebundenen Peroxidase erfolgte mit der Diaminobenzidin(DAB-)Methode nach GRAHAM und KARNOVSKY (125), die Kernfärbung mit Hämalaun. Abschließend wurden die entwässerten Schnitte in Eukitt eingedeckt.

Für Kontrollschnitte wurde das spezifische Anti-Serum durch normales Kaninchenserum ersetzt. Hierbei ergab sich keine Markierung von Zellen.

IV. Die Morphologie des primären Lebercarcinoms nach der WHO-Klassifikation

1. Das primäre Lebercarcinom

ROKITANSKY wies 1849 auf die Existenz eines primären Lebercarcinoms als eigenständige Erkrankung hin (315). Nachdem durch KELSCH und KIENER (166) 1876 die ersten Fallbeschreibungen erschienen, gelang SABOURIN 1881 die histologisch wichtige Trennung in hepatocelluläre und cholangiocelluläre Carcinome (326). EGCEL beschrieb 1901 erstmalig einen Zusammenhang zwischen primärem Lebercarcinom und Zirrhose. Er fand bei 85 % aller malignen Lebertumoren ein zirrhotisch verändertes Organ (79). Außerdem unterteilte er die malignen Lebertumoren nach makroskopischen Gesichtspunkten in nodulär, massiv und diffus wachsende. BERMAN erfaßte 1952 an Hand der Weltliteratur 2000 primäre Lebercarcinome (30).

Das primäre Lebercarcinom zeigt eine sehr unterschiedliche geographische Häufigkeitsverteilung. In Afrika scheinen maligne Lebertumoren wesentlich häufiger vorzukommen. Die relative Häufigkeit, d.h. das Verhältnis zur Gesamtzahl aller Carcinome, beträgt dort bis zu 67 % (339). Außerdem wird das primäre Lebercarcinom in 1,8 % aller Autopsien gefunden (16). Über eine hohe Inzidenz wird auch von Asien berichtet, so stellt z.B. in Malaysien das primäre Lebercarcinom mit 41 % das autopsisch häufigste Neoplasma dar (335). In Europa und Nordamerika findet sich das primäre Lebercarcinom viel seltener, nämlich nur in 0,14 bis 0,5 % aller Obduktionen (103, 223, 285, 328).

Das primäre Lebercarcinom ist in Ländern mit hoher Carcinomhäufigkeit in einem sehr hohen Prozentsatz unter der jungen Bevölkerung zu finden. In Mozambique, dem Land mit der höchsten Carcinominzidenz, werden zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr fast 500 mal so viele maligne Lebertumoren als in den USA beobachtet (145). In Asien liegt der Altersgipfel zwischen 45 und 60 Jahren (26, 155) und in Europa und Nordamerika zwischen

61 und 70 Jahren (59, 145, 273). Das männliche Geschlecht ist beim primären Lebercarcinom eindeutig bevorzugt.

Die in der Literatur immer wieder bestätigte Präferenz des männlichen Geschlechts bei Zirrhosen bzw. Leberzellcarcinomen (HCC) sowie das höhere Lebensalter im letzteren Fall, hat JOHNSON et al (159) zu der Aussage veranlaßt, daß das Alter und das männliche Geschlecht der Patienten mit einer Leberzirrhose - nicht jedoch der HBsAg-Nachweis - als Risikofaktoren für die Entstehung eines primären Leberzellcarcinoms zu gelten haben.

Im Gegensatz dazu stehen die Meinungen von PETERS et al (290) und vor allem von SZMUNESS et al (357, 358), deren Beobachtungen ganz im Sinne einer kausalen Beziehung zwischen Virushepatitis-Infektion und Leberzellkrebs sprechen. In ihren Arbeiten kristallisierte sich heraus, daß eine auffällige Parallelität in der geographischen Verbreitung der Virushepatitis und des Lebercarcinoms besteht und sich bei 50 bis 90 % der Lebertumorpacienten HBs-Antigen oder anti-HBc nachweisen läßt, sowohl in Gegenden mit hoher als auch mit niedriger Lebertumor-Inzidenz. Es ist noch ungeklärt, ob das Hepatitisvirus dabei selbst onkogen oder nur im Sinne einer Co- oder Syncarcinogenese begünstigend wirkt (393).

Die Leberzirrhosen stellen unbestritten potentielle Präkanzerosen dar; 60 bis 90 % aller Leberzellcarcinome entstehen in einem zirrhotisch veränderten Organ (202, 265, 269).

Als ätiologische Faktoren kommen außer der Leberzirrhose und dem Hepatitis-B-Virus noch α_1 -Antitrypsinmangel, Aflatoxine, Vinylchlorid, Parasiten, Thorotrast, anabole androgene Steroide, orale Kontrazeptiva und Immunsuppression in Betracht (293).

α_1 AT-Mangel und Lebererkrankungen wurden erstmalig in Zusammenhang gebracht als man Hepatitiden und Leberzirrhosen bei Kindern und Jugendlichen (336) und etwas später auch beim Erwachsenen (28, 214) beobachtete.

1978 hat die WHO eine Klassifikation der primären Lebercarcinome vorgelegt, die einmal von histologischen und zum anderen von zytologischen Kriterien ausgeht (394).

Der Begriff Hepatom sollte vermieden werden, da diese Bezeichnung nicht eindeutig ist, obwohl sie in der Literatur häufig verwendet wird.

1.1 Das Hepatocelluläre Carcinom (nach der WHO-Klassifikation)

Die unterschiedlichen histologischen Muster und zytologischen Merkmale erscheinen in den unterschiedlichsten Mischungen. Viele, vielleicht sogar alle HCC sind strukturell trabekulär gebaut.

Eine auffallende Charakteristik des HCC ist die Tendenz in Blutgefäße einzubrechen, seltener in Gallengänge.

Die histologischen Muster sind:

1) Trabekulär: Die Tumorzellen wachsen in verschieden starken Trabekeln, die voneinander durch weiträumige Sinusoide mit flachen Endothelzellen getrennt sind. Fibröses Bindegewebe fehlt zwischen den Trabekeln und den Tumorzellen. Manchmal findet man in den sinusoidalen Wänden einige Collagenfasern. In manchen Fällen gruppieren sich die Tumorzellen rosettenförmig um Gefäße, was anfänglich Drüsen ähnelt.

2) Pseudoglandulär: Zu sehen ist eine Variation drüsenartiger Struktur. Canaliculi, mit oder ohne Galle, werden des öfteren entdeckt. Sie können bis zu Acini ausgedehnt sein. Die pseudoglandulären Hohlräume können innerhalb einer teils trabekulären, teils kompakten Struktur liegen. Der Inhalt dieser pseudoglandulären Hohlräume können fettgefüllte Makrophagen sein, fibrinöse Exsudate, zelluläre oder homogene Trümmer oder colloidartiges Material. In diesem Fall wurde eine Ähnlichkeit mit

Thyroidfollikeln erkannt. Der Inhalt kann PAS-positiv sein, sollte aber nicht als Schleim verkannt werden.

3) Kompakt: Die Basis ist eine trabekuläre Struktur, aber die Tumorzellen wachsen offensichtlich in soliden Komplexen. Die Sinusoide sind infolge der Tumorkompression unauffällig.

4) Szirrhös: Gebiete von Tumorzellsträngen getrennt durch reichlich fibröses Stroma. Oft als Folge einer Radiatio, einer Chemotherapie oder eines Infarktes zu beobachten. Derartige Erscheinungen sollten von Cholangiocarcinomen und metastasierenden Tumoren unterschieden werden.

5) HCC vom polygonalen Zelltyp mit fibrösem Stroma (PCFS): Dieser Zelltyp wird nicht nach der WHO klassifiziert: PETERS et al (289, 72a) haben es als eosinophiles hepatocelluläres Carcinom mit lamellärer Fibrose beschrieben. Nach der neuen Nomenklatur wird es als HCC vom polygonalen Zelltyp mit fibrösen Stroma bezeichnet (30a). Charakterisiert ist dieser HCC-Zelltyp durch lamelläres Bindegewebe und eosinophiles Zytoplasma der Carcinomepithelien. Feine kollagene Fasern sind dicht und parallel verlaufend angeordnet, umgeben von malignen Hepatocyten, deren Form von polygonal bis spindelförmig variiert. Das Zytoplasma ist kräftig eosinophil und teils granulär. Manchmal ist in der Umgebung eine fokale noduläre Hyperplasie zu finden.

Die Zytologie zeigt folgende Varianten:

1) Pleomorph: Bizarre Riesenzellen sind zu sehen. Hyperchromatisierung ist ein bekanntes Merkmal pleomorpher Zellen. Die zellulären Zusammenhänge können verlorengehen.

2) Klarzellen: Der überwiegende Teil der Tumorzellen besitzt ein klares Zytoplasma, hervorgerufen durch Glykogen und/oder Fett.

3) Andere: Kleine Tumorzellen mit wenig Zytoplasma oder spindelförmige Tumorzellen. Diese Formen kommen jedoch seltener vor.

Schleimbildung kommt beim HCC nicht vor, wird aber häufig bei Cholangiocarcinomen gefunden.

Eisen und Lipofuszin wurden in Tumorzellen nicht gefunden. Pigmentablagerung ist wahrscheinlich durch Galle hervorgerufen. Um dies zu erkennen, sind Spezialfärbungen nötig.

1.2 Das Cholangiocarcinom (nach der WHO-Klassifikation)

Ein intrahepatischer, bösartiger Tumor mit einer epithelialen Komponente, die dem Galleepithel ähnelt. Gewöhnlich fällt eine glanduläre Struktur des Cholangiocarcinoms auf. Ein tubuläres Muster ist üblich, gelegentlich auch ein papilläres.

Die Zellen können klein oder groß sein, kubisch, zylindrisch oder pleomorph. Die meisten haben ein eosinophiles oder blasiges Zytoplasma, manchmal ist es granulär. Schleimbildung kann bei den meisten demonstriert werden. Reichlich fibröses Stroma ist ein wichtiges Charakteristikum dieser Tumoren.

Das Cholangiocarcinom kann histologisch allein nicht vom Adenocarcinom der Gallenblase, der extrahepatischen Gallengänge oder des Pankreas unterschieden werden. Es teilt die Tendenz dieser Tumoren, rund um die Nerven zu infiltrieren. Gelegentliche dysplastische Veränderungen in benachbarten Gallengängen bestärken die Annahme eines Cholangiocarcinoms. Einige Tumoren wachsen in strangartigen Mustern, die an ein trabekuläres HCC erinnern. Die Stränge sind durch ein Bindegewebsstroma und nicht durch Sinusoide abgegrenzt; Canaliculi fehlen auch. Diese Merkmale dienen zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Tumoren.

Die folgenden Varianten des Cholangiocarcinoms werden unterschieden:

1) Schleimig: Ein bösartiger, glandulärer Tumor, der große Mengen extrazellulären Schleims enthält; meist mit dem bloßen Auge erkennbar und mikroskopisch im verdrängenden Stroma zu sehen.

2) Siegelringzellen: Ein maligner Tumor, dessen Merkmal abge sonderte, durch Schleim ausgedehnte Zellen sind.

3) Adenosquamös: Ein Adenocarcinom, welches eindeutig schuppige, carcinomatöse Elemente enthält, wie z.B. Keratin und/oder interzelluläre Bestandteile.

Beispiele von offensichtlich reinen Plattenepithelcarcinomen wurden selten aufgezeichnet.

4) Mucoepidermoid: Es enthält beide Typen von Epithelien, eng vermischt in Nestern.

V. Eigenschaften der Marker

1. Das carcinoembryonale Antigen (CEA) und seine Eigenschaften

Auf der Suche nach tumorspezifischen Antigenen isolierten GOLD und FREEDMAN (114) 1965 erstmals das CEA aus entodermalen Geweben menschlicher Feten des 2. bis 6. Graviditätsmonates und aus Adenocarcinomen des Gastrointestinaltraktes.

Die chemische Struktur des CEA ist in den letzten Jahren genauer untersucht worden. KRUPPEY et al (181) charakterisierten es als Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 200.000. Seine immunoelektrophoretische Beweglichkeit liegt im Bereich der beta-Globuline. Es weist eine Sedimentationskonstante von 7 bis 8 S auf und der isoelektrische Punkt wird bei 4,8 angegeben. Das CEA ist weitgehend hitzestabil und enzyminaktiv. TERRY et al (371) bestimmten 1972 die Aminosäurefrequenz des terminalen Endes des CEA.

Die Ausscheidung des CEA ist noch wenig erforscht. Wegen seines hohen Molekulargewichtes ist eine Filtration durch die Nieren sehr unwahrscheinlich (181), da die Basalmembranen der Glomeruli schon Serumalbumin (MG 70.000) nur noch in Spuren durchläßt. Es ist auch nicht bekannt, ob während der Zirkulation oder in der Leber CEA abgebaut und dann nierengängig wird. Eine tubuläre Sekretion des CEA ist bisher ebenfalls nicht nachgewiesen worden. Im Stuhl von Patienten mit Darmkarzinom konnte CEA isoliert werden (6).

Untersuchungen von ZAMCHEK (400, 401) sprechen für eine immunsuppressive Wirkung des CEA auf die zellvermittelte Immunität. ZAMCHEK hat nachgewiesen, daß das Ausmaß der lymphozytären Randwallinfiltration von Kolon- und Rektum-Karzinomen im reziproken Verhältnis zum Plasma-CEA-Titer steht.

Nach GOLD (116) soll der Organismus eines Karzinomträgers auf das CEA mit der Bildung von Anti-CEA-Autoantikörpern reagieren. Neuere Untersuchungen von LO GERFO (220) stellen diese Autoantikörperbildung in Frage und führen den positiven Ausfall

des Tests auf eine antigenetische Verwandtschaft des CEA-Moleküls mit den ABO-Blutgruppensubstanzen zurück.

2. Das alpha-Fetoprotein (AFP) und seine Eigenschaften

Die biophysikalischen und biochemischen Strukturen des AFP wurden weitgehend untersucht. Das Protein wurde erst 1970 gereinigt und 1971 chemisch charakterisiert (254, 320). Es ist ein saures Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 61.000 und 75.000. Die immunoelektrophoretische Beweglichkeit liegt im α_1 -Bereich (147, 148, 254, 319, 320) und die Halbwertszeit beträgt zwischen 2 und 9 Tagen (17, 111, 147, 189, 190, 322). Das AFP weist eine Sedimentationskonstante von 4,5 S, einen isoelektrischen Punkt von 4,7 und einen Kohlenhydratgehalt von rund 4 % auf, davon 0,9 % Neuraminsäure (320).

Das von einem Lebercarcinom gebildete AFP und das embryonale AFP können aufgrund des verschiedenen Gehaltes an Neuraminsäure unterschieden werden (303).

Immunologisch unterscheiden sich AFP aus Tumorgewebe, Plasma, Pleurapunktat und Aszites nicht (206).

Die physiologische Funktion des AFP ist weitgehend ungeklärt (126). Diskutiert werden eine mögliche Schutzfunktion für den Feten gegenüber den mütterlichen Östrogenen oder vor der immunologischen Abstoßung durch die Mutter, eine fetale Form des Albumins oder ein spezielles Transportprotein (325, 385). Eine immunsuppressive Wirkung auf die zellvermittelte Immunität, ähnlich wie beim CEA (374, 400, 401), wurde beim menschlichen AFP nachgewiesen (23).

3. Das α_1 -Antitrypsin (α_1 AT) und seine Eigenschaften sowie der Erbmodus des α_1 -Antitrypsin-Mangels (ATM)

Das α_1 AT ist ein Glykoprotein, aus dem 90 % der α_1 -Globulinfraction des Serumeiweißes besteht (186). Seine Synthese findet in der Leber statt (244). Zu 12,2 % besteht das Glykoprotein aus Kohlenhydraten mit Sialsäure (142, 143). Es hat ein Molekulargewicht von ca. 45 000 - 54 000 und eine Sedimentationskonstante von 3,4 (66, 90). Die Halbwertszeit beträgt nach KUEPERS (185) 3 Tage und 22 Stunden, nach anderen Autoren (228) 5 bis 6 Tage.

Beim Menschen wurde das α_1 AT im Serum, im Kolostrum und in der Muttermilch nachgewiesen (43). Es stellt den wichtigsten Proteaseinhibitor des menschlichen Serums dar und hemmt neben dem Trypsin eine Reihe anderer proteolytischer Enzyme (142).

Das α_1 AT wird von einem Paar autosomal gebundener Gene kontrolliert, für die FAGERHOL et al (93) 17 und MORSE (244) 26 verschiedene kodominante Allele beschreiben. FAGERHOL et al (91, 93, 94) faßten die von ihnen dargestellten molekularen α_1 AT-Varianten F (fast), M (medium), X (slow) und Z (deficient) zum Pi-System (protease inhibitor system) zusammen, wobei die Buchstaben in der Reihenfolge des Alphabets sich auf die relative Mobilität in der Elektrophorese beziehen, d.h. PiZ wandert am langsamsten.

Am häufigsten kommt das PiM-Allel vor, das bei einer homozygoten Konfiguration und einem Phänotyp PiM für die Aufrechterhaltung einer normalen α_1 AT-Konzentration im Serum verantwortlich ist (274, 378). Die wesentlich seltener vorkommenden Allele PiS und vor allem PiZ bewirken dagegen eine Senkung des Serumspiegels von α_1 AT (378). So beträgt dieser bei Homozygoten PiZ nur etwa 10 - 15 % des normalen Wertes, was als Ausdruck eines schweren genetisch bedingten α_1 AT-Mangels (ATM) gewertet wird (186, 378).

FAGERHOL (395) hat für den ATM eine kodominante Transmission vorausgesetzt, charakterisiert durch die Veränderung eines strukturellen Genes.

4. Das HBsAg und seine Eigenschaften

Das HBsAg ist identisch mit dem 1965 von BLUMBERG (37) entdeckten Australia-Antigen. Es bildet die äußere Hülle (Surface) des kompliziert aufgebauten Hepatitis-B-Virus.

Das HBsAg ist nicht, wie ursprünglich vermutet wurde, das eigentliche infektiöse Agens, stellt jedoch ein wichtiges Kennzeichen potentieller Infektiosität dar. Es kann, als Teilstück des Virus, auch isoliert als kleines kugeliges oder längliches Gebilde im Serum auftreten (36, 109).

Das HBsAg besteht elektronenmikroskopisch aus sphärischen 20 nm großen Partikeln und tubulären Strukturen wechselnder Länge. Dieses Hüllenprotein ist DNA-frei (31).

Am HBsAg wurden bisher mindestens 5 verschiedene antigene Subspezifitäten nachgewiesen. Hieraus resultieren 10 Serotypen des HBsAg, die bestimmten Genotypen des Hepatitis-B-Virus entsprechen, was aber lediglich epidemiologisch wichtig ist (36, 109).

Die chemische Struktur des HBsAg ist noch nicht eindeutig geklärt. BLUM (36) zeigt in seinen neueren Untersuchungen, daß die Hülle des Hepatitis-B-Virus wahrscheinlich durch die Assoziation eines einzigen Polypeptids mit einem Molekulargewicht von ca. 80 000 aufgebaut ist und sich immunologisch nicht vom nativen HBsAg aus dem Serum von Trägern unterscheidet. Immunologisch findet keine Kreuzreaktion mit Anti-HBc, Anti-HBe und Anti-Humanserum statt.

Seit der Etablierung HBsAg-produzierender Zelllinien 1975 von primären hepatocellulären Carcinomen des Menschen, können die Regulation der HBV-Synthese in Hepatocyten und die Zusammenhänge zwischen HBV-Infektion und der hepatocellulären Carcinogenese teilweise in vitro analysiert werden (7, 13, 136, 225, 361). Es bietet außerdem noch den Vorteil, die Qualität des HBsAg zu präzisieren. Untersuchungen zeigen, daß das Leber-HBsAg dem Serum-HBsAg in Größe, Morphologie und Dichte ähnelt (346).

VI. Resultate

Untersucht wurden 82 primäre Lebercarcinome, dabei handelt es sich überwiegend um Autopsiematerial aus dem Untersuchungsgut von 1968 bis 1983 und in acht Fällen um Operationsmaterial (Nr. 75 - 82).

Eine Übersicht gibt Tab. 1, aufgeschlüsselt nach Alter, Carcinome, Leberfibrose bzw. -zirrhose, sowie nach den einzelnen Markern im Tumor und im Lebergewebe. Außerdem zeigt die Tab. 1 bei den acht chirurgischen Fällen die Serumwerte dieser Marker.

(/ = keine positiven Zellen nachweisbar; - = negativ;
freies Feld = Serumwert wurde nicht bestimmt)

Beim Nachweis der einzelnen Marker war immer nur ein Teil der Tumorzellen bzw. nicht tumorösen Hepatocyten positiv. Die Anzahl dieser positiven Zellen wurde nach Schätzung in 3 Gruppen angegeben: 1) ≤ 10 %, 2) 10-50 %, 3) > 50 %. Eine Übersicht über die Marker-positiven Fälle, aufgeschlüsselt nach Marker, sowie Anzahl der positiven Zellen im Tumor und Lebergewebe zeigt die Tab. 2.

Die Immunhistochemie der primären Lebercarcinome ergab bei Anwendung der vier Marker in 46 Fällen positiv markierte Zellen. Diese schlüsseln sich folgendermaßen auf (Tab. 3). Dabei enthalten 28 Tumoren nur 1 Antigen und 18 mehrere Antigene.

Bei der Altersverteilung (Abb. 1) der autopsischen Fälle mit primärem Lebercarcinom liegt der Altersgipfel zwischen dem 65. und 70. Lebensjahr. Zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht besteht kein Unterschied. Die chirurgischen Fälle (n = 8) sind nicht dargestellt.

Aus der Abb. 2 ist die Klassifizierung der 82 primären Lebercarcinome in 70 Hepatocelluläre Carcinome, 9 Cholangiocarcino-

me und 3 kombinierte primäre Lebercarcinome ersichtlich.

Die Verteilung der histologischen Muster bei den 70 Hepatocellulären Carcinomen zeigt die Übersicht der Abb. 3. Die Subklassifizierung ergab 31 trabekuläre, 17 trabekulär-pseudoglanduläre, davon eins mit Gallebildung, 10 kompakte, 6 trabekulär-kompakte, 2 kompakt-pseudoglanduläre, 1 pseudoglanduläres, 1 trabekulär-kompakt-pseudoglanduläres HCC und 2 HCC mit polygonalem Zelltyp und fibrösem Stroma.

Die 9 Cholangiocarcinome unterteilen sich in 4 glanduläre, 3 tubulär-glanduläre und 2 tubuläre Cholangiocarcinome (Abb. 4).

Die Geschlechtsverteilung bei primären Lebercarcinomen zeigt eine eindeutige Bevorzugung der Männer; das Verhältnis ist 2 : 1.

Von 82 primären Lebercarcinomen sind 63 mit Leberzirrhose kombiniert. Davon sind 54 Fälle Hepatocelluläre Carcinome und 6 Fälle Cholangiocarcinome.

Die Abbildungen 5 bis 13 zeigen die verschiedenen Markerspezifischen Reaktionen im histologischen Bild. Die Legenden sind dem jeweiligen Bild zugeordnet.

Tab. 1 Aufschlüsselung von primären Lebercarcinomen
(n = 82) nach verschiedenen Kriterien

[illegible]

Fall-Nr.	1	2	3	4	5	6	11	14	15	19	22	24	26	27	28	31
CEA	Tumor <10%		<10%	<10%		<10%	<10%								10- 50%	
	Leber- gewebe														<10%	
a-AT	Tumor			>50%		<10%		<10%			<10%	<10%			10- 50%	
	Leber- gewebe														<10%	
AFP	Tumor <10%	<10%		<10%								10- 50%			10- 50%	
	Leber- gewebe															
HbsAg	Tumor						<10%									10- 50%
	Leber- gewebe				<10%		10- 50%			10- 50%			<10%		10- 50%	

Tab. 2

Isoliertes (n = 28) und kombiniertes (n = 18) Auftreten Marker-positiver Fälle (n = 46) im Tumorgewebe und im nicht tumorösen Lebergewebe von primären Lebercarcinomen (n = 82)

Fall-Nr.	32	36	37	39	41	43	44	48	51	53	54	57	59	62	63	64
CEA	Tumor	10-50%			>50%			<10%	<10%	<10%			MCC <10% MCC 10-50%			<10%
	Leber-gewebe	<10%														
a ¹ AT	Tumor	10-50%				<10%		10-50%			10-50%		MCC 10-50% MCC 10-50%		<10%	<10%
	Leber-gewebe			<10%			>50%									
AFP	Tumor											10-50%	MCC 10-50% MCC <10%	<10%		
	Leber-gewebe								>50%							
HbsAg	Tumor															
	Leber-gewebe		10-50%			<10%										

Tab. 2 Fortsetzung

Fall-Nr.	65	66	67	68	70	73	74	75	77	78	79	80	81	82
CEA	Tumor			<10%										
	Lebergewebe	<10%												
a ₁ -AT	Tumor	<10%		>50%	10-50%	<10%	10-50%	10-50%	<10%	10-50%	10-50%	<10%	>50%	10-50%
	Lebergewebe													
AFP	Tumor	10-50%					>50%		10-50%				10-50%	>50%
	Lebergewebe													
IllusAg	Tumor		<10%											
	Lebergewebe		<10%				10-50%							10-50%

Tab. 2 Fortsetzung

	CEA		α_1 AT		AFP		HBsAg	
	Tumor	Leber- gewebe	Tumor	Leber- gewebe	Tumor	Leber- gewebe	Tumor	Leber- gewebe
Hepatocellu- läres Ca	14% (n=10)	3% (n=2)	34% (n=24)	4% (n=3)	19% (n=13)	/	4% (n=3)	14% (n=10)
Cholangio- carcinom	22% (n=2)	/	33% (n=3)	/	/	/	/	/

Tab. 3

Aufschlüsselung der verschiedenen Marker-positiven Fälle primärer Lebercarcinome (n = 46) im Tumorgewebe und im nicht tumorösen Lebergewebe von Hepatocellulärem Carcinom (n = 70) und Cholangiocarcinom (n = 9)

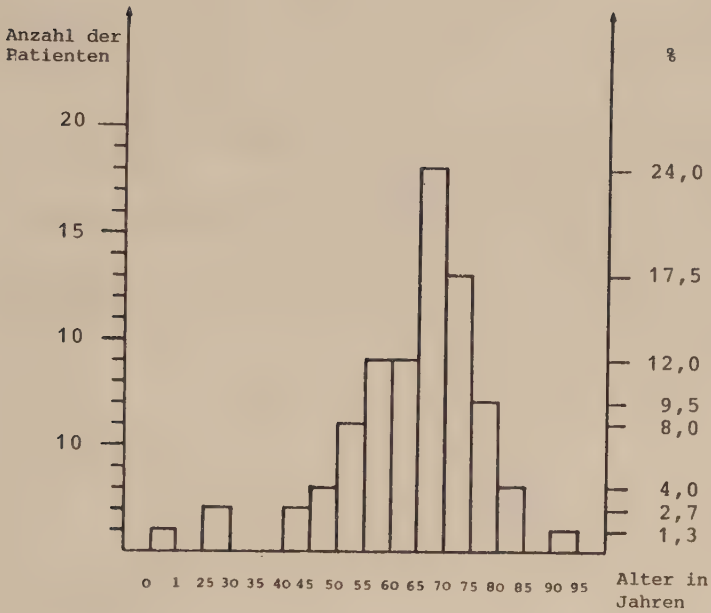


Abb. 1

Altersverteilung der autopsichen Fälle mit
primärem Lebercarcinom (n = 74)

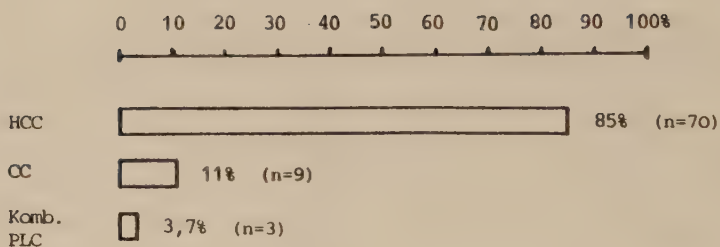


Abb. 2

Aufschlüsselung der primären Lebercarcinom-Fälle (n = 82) in Hepatocelluläres Carcinom, Cholangiocarcinom und kombiniertes primäres Lebercarcinom

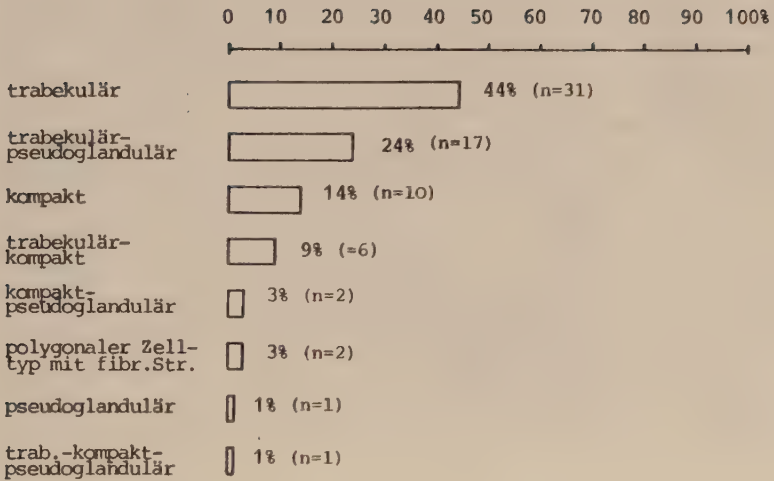


Abb. 3

Verteilung der histologischen Muster bei
Hepatocellulären Carcinomen (n = 70)

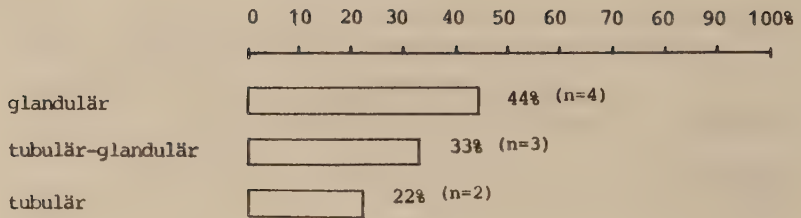


Abb. 4

Verteilung der histologischen Muster bei
Cholangiocarcinomen (n = 9)

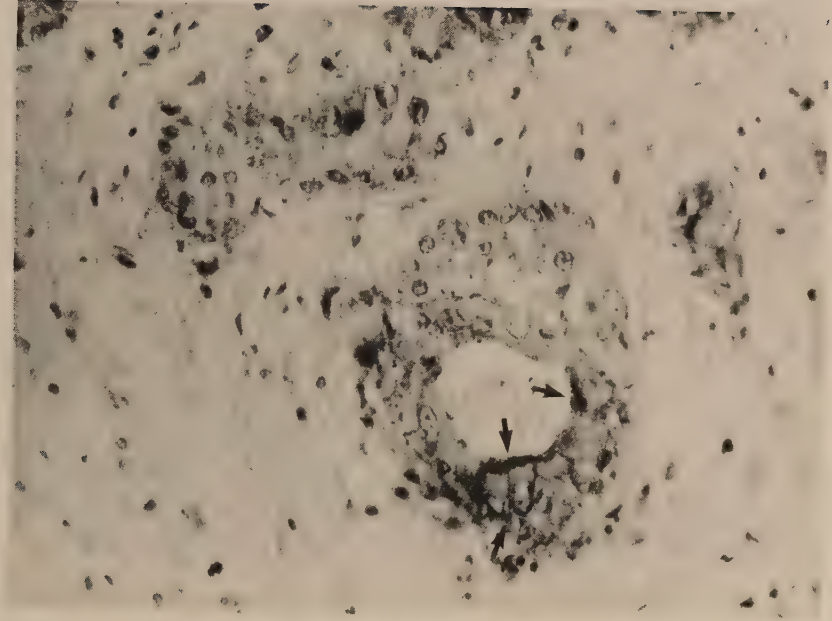


Abb. 5

CEA-spezifische Reaktion, betont in der Zellperipherie und am apikalen Zellpol, entsprechend dem Saum des Drüsenlumens von Cholangiocarcinomepithelien. Das bräunliche Reaktionsprodukt erscheint in allen Abbildungen als schwarze Reaktion. (PAP-Methode, 450 x, Fall-Nr. 32)

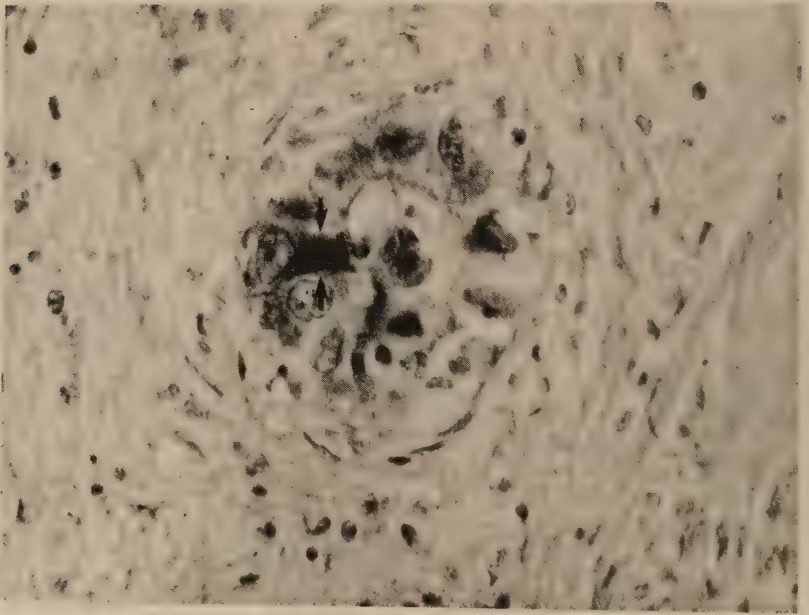


Abb. 6

Diffuse CEA-spezifische Reaktion in
einer Cholangiocarcinomepithelie
(PAP-Methode, 720 x, Fall-Nr. 59)

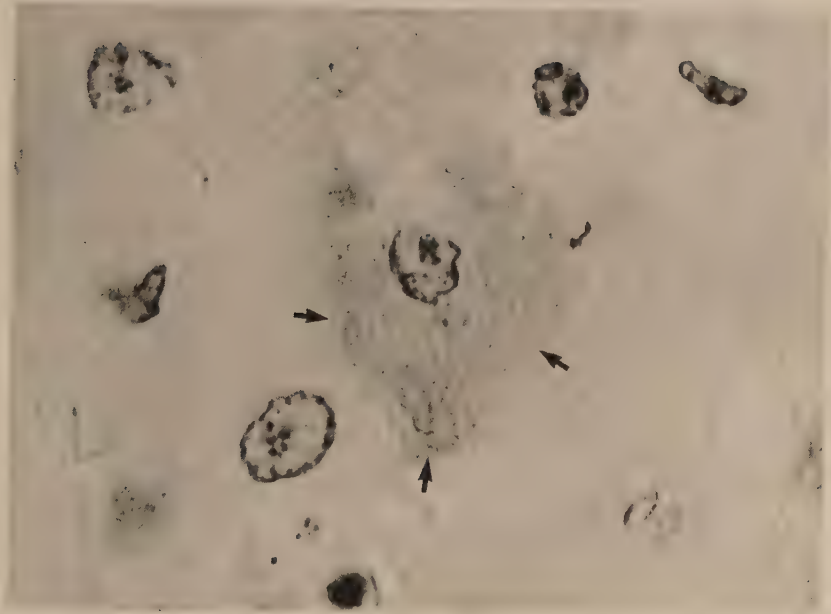


Abb. 7

Schwache, diffuse CEA-spezifische
Reaktion in einem nicht tumorösen
Hepatocyten

(PAP-Methode, 1800 x, Fall-Nr. 32)



Abb. 8

Diffuse AFP-spezifische Reaktion im
Cytoplasma einer hepatocellulären
Carcinomepithelie
(PAP-Methode, 1800 x, Fall-Nr. 81)

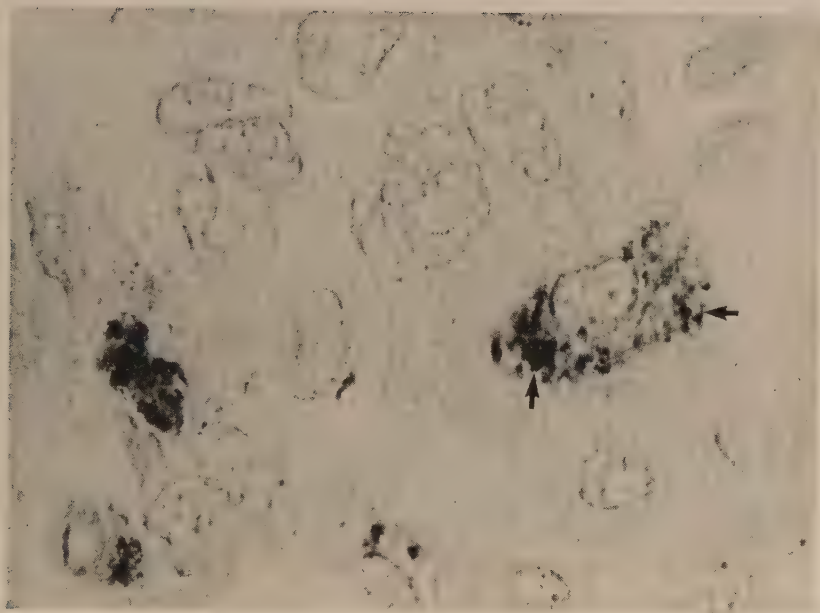


Abb. 9

Diffuse und granuläre intracytoplasma-
tische AFP-positive Reaktion in einer
hepatocellulären Carcinomepithelie
(PAP-Methode, 1800 x, Fall-Nr. 28)

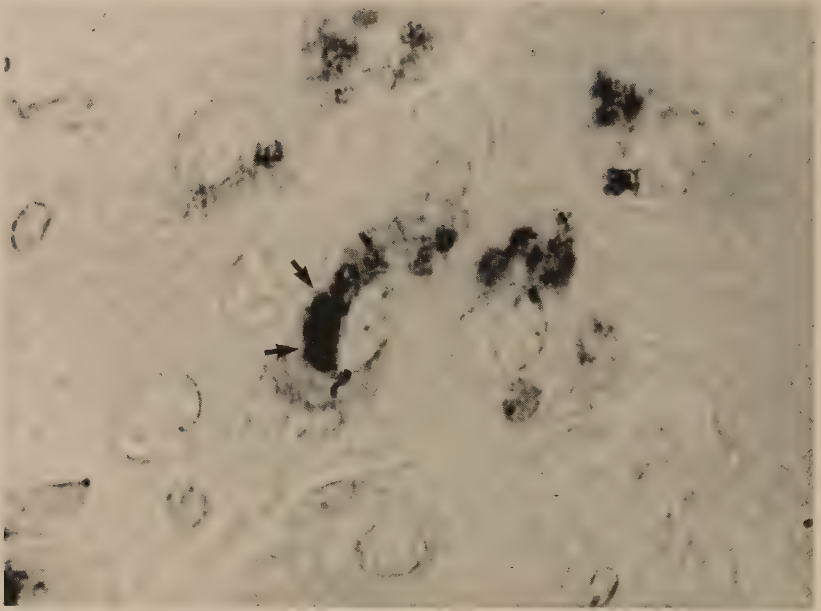


Abb. 10

Hepatocelluläres Carcinom vom polygonalen Zelltyp mit fibrösem Stroma.
Perinucleäre AFP-positive-Reaktion
im Cytoplasma einer hepatocellulären
Carcinomepithelie
(PAP-Methode, 1800 x, Fall-Nr. 77)

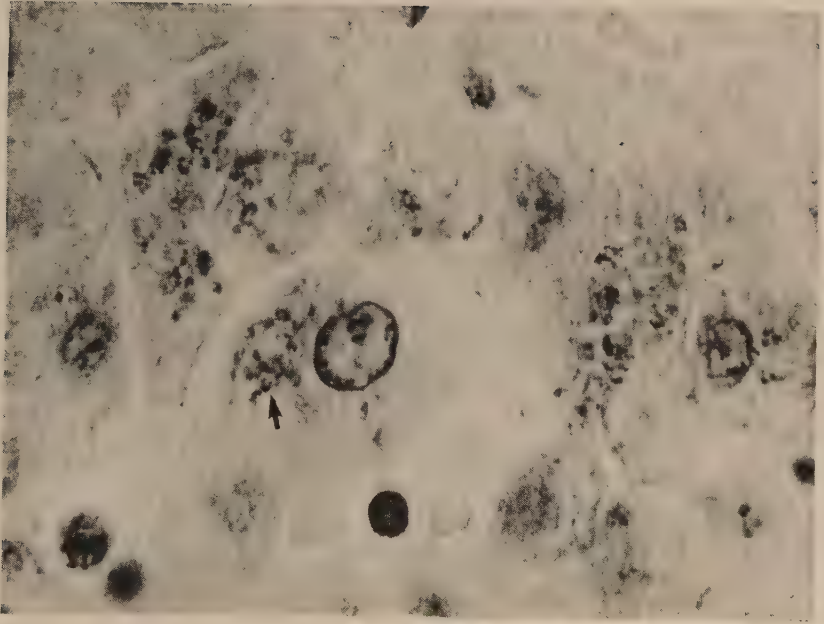


Abb. 11

Feingranuläre α_1 AT-spezifische Reaktion
im Cytoplasma eines nicht tumorösen
Hepatocyten
(PAP-Methode, 1800 x, Fall-Nr. 73)

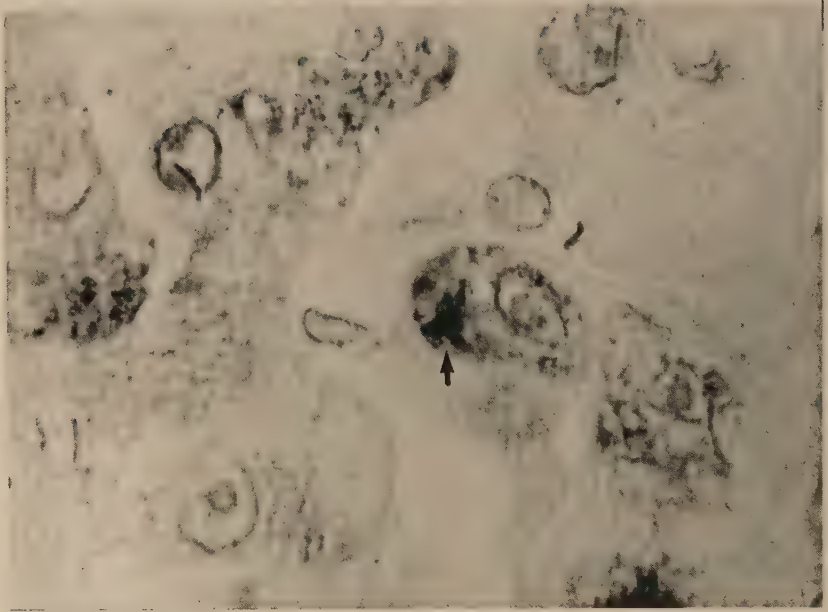


Abb. 12

α_1 AT-spezifische Reaktion in einer
hepatocellulären Carcinomepithelie
(PAP-Methode, 1800 x, Fall-Nr. 22)

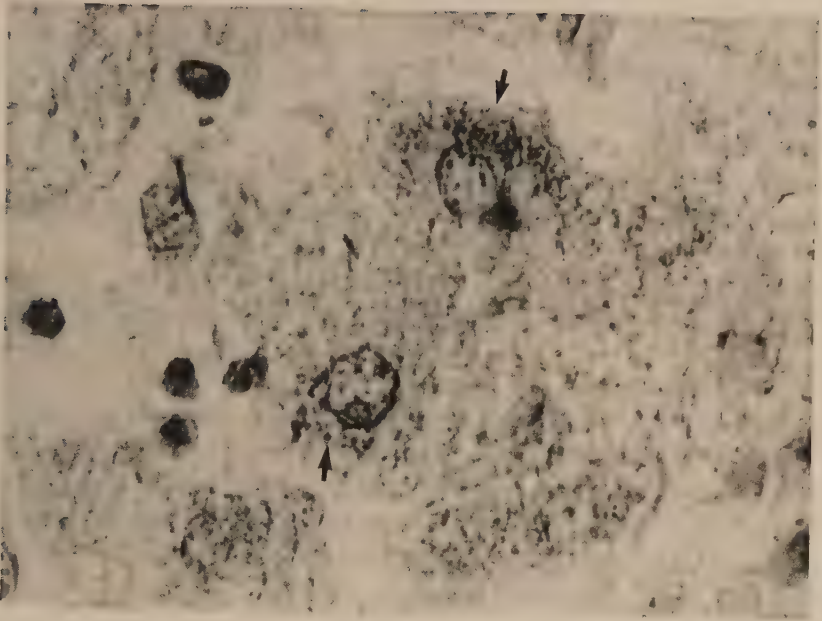


Abb. 13

Schwache HBsAg-positive Reaktion im
Cytoplasma von nicht tumorösen
Hepatocyten
(PAP-Methode, 1800 x, Fall-Nr. 19)

VII. Diskussion

1.1 CEA im Serum

Mit der Entdeckung 1969 von CEA im Serum von Patienten mit Colon-Carcinom (118), setzte eine systematische Forschung ein, die in den letzten Jahren in der klinischen Onkologie Bedeutung gewann.

Gering erhöhte CEA-Serumspiegel wurden auch gemessen beim Mammacarcinom (191, 229), Uteruscarcinom (248), Hypernephrom und bei anderen Malignomen (64, 196, 252).

Von MORRE et al (306) wurden erhöhte Plasma-CEA-Werte bei Urämikern und von HANSEN (138) bei starken Rauchern beschrieben.

Der CEA-Serumspiegel ist auch erhöht bei Entzündungen der Organe entodermalen Ursprungs, liegt jedoch niedriger als bei maligner Entartung des gleichen Organes (Sammelstatistik bei 191). Ein erhöhter CEA-Serumspiegel begründet aber immer einen Malignitätsverdacht, denn bei deutlich erhöhten CEA-Werten handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um einen malignen Tumor (262).

Nach KHOO et al (170, 171) und ZAMCHEK et al (400) scheinen eine Leberzelldegeneration, eine Leberzirrhose und eine verschlechterte Leberzellfunktion mit einer CEA-Konzentrationserhöhung im Blut einherzugehen. Im Gegensatz zu ZAMCHEK et al (240, 400, 401), die nur bei alkoholischen Leberzirrhosen eine CEA-Erhöhung sehen, zeigt diese Studie im Einklang mit BOOTH et al (44) ein erhöhtes CEA bei allen Leberzirrhosearten.

GERBER und THUNG (108) berichten über eine Erhöhung von CEA im Serum bei der Mehrheit der Patienten mit alkoholbedingten Lebererkrankungen und einer geringeren Häufigkeit bei Patienten mit nicht alkoholbedingten Lebererkrankungen.

Eine zunehmende Produktion oder Freigabe von CEA durch hepatische Metabolismen oder eine verminderte Absonderung von CEA extrahepatischen Ursprungs wird diskutiert (108).

Nach HANSEN (137) erscheint das CEA im Blut bei jeder Art vermehrten cell-turn-overs. So ist die in geringerem Ausmaß auch schon im Rahmen entzündlicher Darmerkrankungen, z.B. der Colitis ulcerosa oder Divertikulitis (24, 53, 77), oder die bei benignen Darmpolypen im Gewebe (45) gefundene Steigerung des CEA-Gehaltes ohne Hinweis auf eine laufende Karzinogenese zu verstehen. Bei der aktiven Colitis ulcerosa und dem aktiven M. Crohn fanden sich in Übereinstimmung mit RULE et al (317), aber im Gegensatz zu BOOTH et al (44) erhöhte Plasma-CEA-Werte.

LO GERFO et al (221) sind der Auffassung, daß die Plasma-CEA-Konzentration bei der Primärdiagnose von Colon-Carcinomen prognostische Aussagen ermöglicht.

HINE et al (146) weisen auf den möglichen Wert der Bestimmung von CEA bei bösartigen Lebererkrankungen hin. Auch RICHART et al (312) berichten, daß bei 79 % der Fälle von HCC die Serumwerte höher als normal waren, jedoch erreichen sie gewöhnlich nicht die Stufe, die bei Lebermetastasen üblich ist. Da auch bei Patienten mit Leberzirrhose (alkohol- und nicht alkoholbedingte) höhere CEA-Serumwerte als normal gefunden wurden, sind nach Meinung von RICHART et al (312) CEA-Plasma-Konzentrationen nicht verwertbar, um Patienten mit oder ohne HCC zu unterscheiden.

1.2 CEA im histologischen Schnitt

1.2.1 CEA-Nachweis in unterschiedlichen Geweben

VON KLEIST und BURTIN (173, 174, 175) lokalisierten 1969 das CEA mit Hilfe der Immunfluoreszenz am apikalen Pol der Carcinomzellen vom glandulären Typ und zeigten, daß sich das CEA auch bei Aufgabe der glandulären Struktur der carcinomatösen Zellen an deren Peripherie wiederfindet. Auch von anderen Autoren (45, 229) wurde CEA am apikalen Pol und am Saum des Drüsenlumens maligner und benigner, sowie nicht tumoröser Zel-

len gefunden. Diese Strukturanordnung hat sich auch in embryonalem und fetalem Gewebe bestätigt.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde von GOLD et al (191, 141, 173) 1970 gezeigt, daß das CEA bei Colonicarcinomzellen ein Bestandteil der Glykokalyx darstellt, außerdem von der Zelle sezerniert wird und auf diese Weise die Blutbahn erreichen kann.

Die Untersuchungen von GOLD und FREEDMAN (115, 117, 119) und von KHOO (171) zeigten, daß CEA in niedrigsten Konzentrationen praktisch in sämtlichen Organen von Normalpersonen vorkommt. Dies bestätigt die These, daß das Auftreten von erhöhten CEA-Konzentrationen in malignen Tumoren letztlich ein quantitatives und kein qualitatives Phänomen darstellt.

Das CEA ist wie das AFP ursprünglich ein regelmäßiger Bestandteil embryonaler Zellen. Mit fortschreitender Differenzierung der Zellen wird die Synthese jedoch genetisch gehemmt, so daß in der erwachsenen, differenzierten Normalzelle nur noch Spuren nachweis sind (118).

Schon bei chronischen Entzündungen jedoch kann es zu einer Gendepression kommen, die dann bei Carcinomentstehung nicht mehr steuerbar ist. Das CEA wird nach erfolgter Derepression erneut produziert und auch in das Serum abgegeben (262, 391).

CEA fand sich in verschiedenen hohen Konzentrationen in fast allen Tumoren entodermalen Ursprungs wie Colon-, Magen- (45, 58, 114, 115, 171, 175, 176), Pankreas- (17, 239) und Bronchialcarcinomen (32, 196, 219, 306), sowie in entzündlichen Darmabschnitten Erwachsener und Kleinkinder und im Mekonium Neugeborener (52, 53, 120). In geringen Mengen wurde es auch im Normalgewebe nachgewiesen (56, 218, 306, 324, 368).

JAUTZKE und ALTENÄHR (156) konnten in 57% der Fälle von Übergangszellkarzinomen (TCC) der Harnblase immuncytochemisch mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Technik nach STERNBERGER et al CEA positive Tumorzellen nachweisen. Sie fanden es diffus,

globulär oder vereinzelt an der Peripherie der Tumorzellen.

1.2.2 Nachweis CEA-positiver Tumorzellen im primären Lebercarcinom

In unserer Untersuchung zeigten 14 Fälle (17 %) der 82 PLC-Fälle CEA-positive Tumorzellen, 11 Fälle waren mit Zirrhose verbunden. Die CEA-positiven Zellen waren herdförmig im Tumorgewebe verteilt oder es markierten sich nur einzelne Tumorzellen (Abb. 5 und 6). Die positive Reaktion war diffus im Zytoplasma.

Gelegentlich fand sich eine schwache bis mittlere positive Reaktion an dem lumenwärts gelegenen Zellrand der nicht tumorösen Gallengänge. Dies haben wir nicht als spezifisch bewertet.

Auch GERBER und THUNG (108) berichten von normalem Lebergewebe, in dem CEA, mittels indirekter Immunfluoreszenz, am apikalen Zytoplasma-Pol und längs der luminalen Oberfläche der Gallengangsepithelzellen gefunden wurde. Bei Patienten mit alkoholbedingter Hepatitis und/oder Zirrhose fanden sie in den Leberbiopsien in 80 % der Fälle eine auffallende Gallengangsproliferation und eine herausstechende CEA-spezifische-Färbung, beides verbunden mit hohen CEA-Plasmaspiegeln. GERBER und THUNG (108) nehmen an, daß sich CEA im normalen Lebergewebe unter normalen Bedingungen ansammelt und durch den Gallengang abgesondert wird, und daß proliferierende Gallengänge dazu beitragen, das Plasma-CEA bei Alkohol-Patienten zu erhöhen (108). Demgegenüber betrachten ENDO et al (81a) und KODAMA et al (176a) diese Reaktion als Ausdruck eines unspezifischen, kreuzreagierenden Antigens, dem sog. NCA_2 .

CEA entdeckten wir in 14 % (n = 10) von 70 HCC-Fällen, THUNG et al (375) in 30 % (n = 11) von 37 HCC-Fällen.

Zwei der neun Cholangiocarcinome und zwei der drei kombinierten PLC zeigten ebenfalls CEA-positive Zellen (Abb. 5 und 6).

1.2.3 Die %-Verteilung der CEA-positiven Zellen im Tumorgewebe primärer Lebercarcinome

Die Menge der CEA-positiven Zellen im Tumorgewebe der HCC lagen in acht Fällen unter 10 % der Tumorzellen, in einem Fall zwischen 10 und 50 % und in einem Fall über 50 %.

In den zwei Fällen von Cholangiocarcinom war die Verteilung im Tumorgewebe unter 10 %.

Ein kombiniertes PLC zeigte nur im HCC zwischen 10 und 50 % positive Tumorzellen, während das andere im HCC unter 10 % und im Cholangiocarcinom zwischen 10 und 50 % aufwies.

1.2.4 Kombiniertes Auftreten CEA-positiver Tumorzellen mit anderen Antigenen

In unserer Untersuchung waren 10 (71 %) der 14 CEA-positiven PLC kombiniert mit anderen Antigenen. Eins der 14 CEA-positiven PLC ist ein kombiniertes PLC. Im HCC-Anteil trat CEA mit AFP und im Cholangiocarcinom-Anteil mit AFP und α_1 AT auf.

Ein Fall ist ein Cholangiocarcinom, in dem CEA mit α_1 AT gefunden wurde.

Acht der CEA-positiven Fälle sind HCC, kombiniert in drei Fällen mit α_1 AT, in zwei Fällen mit AFP, in zwei Fällen mit AFP und α_1 AT und in einem Fall mit HBsAg. Das heißt, daß in 11% ($n = 8$) der 70 HCC-Fälle CEA in Kombination mit anderen Antigenen aufgetreten ist, am häufigsten mit α_1 AT, gefolgt von AFP. Dies geht auch aus der Studie von THUNG et al (375) hervor.

Unsere Studie zeigt, daß 20 % ($n = 14$) der HCC-Fälle ($n = 70$) zwei oder mehr Antigene enthalten. Im Gegensatz dazu berichten THUNG et al (375) von 54 % ($n = 20$), sowie über das gleichzei-

tige Auftreten zwei verschiedener Antigene in einer Tumorzelle. Daraus ist zu schließen, daß HCC-Zellen phänotypisch und funktionell heterogen sind, auch wenn sie histologisch monomorph erscheinen.

1.2.5 Nachweis CEA-positiver Zellen im nicht tumorösen Lebergewebe bei primären Lebercarcinomen

In zwei der 14 Fälle von CEA-positiven Tumorzellen fanden wir eine schwache CEA-spezifische Reaktion nur in ganz vereinzelteten nicht tumorösen Hepatocyten (Abb. 7). Die Anzahl der positiven Hepatocyten lag unter 10 %.

Ein HCC-Fall war im Tumorgewebe negativ, wies jedoch, in weniger als 10 % der nicht tumorösen Zellen, CEA-positive Reaktionen auf.

2. AFP-Nachweis

2.1 AFP im Serum

Das AFP wurde erstmals 1944 von PEDERSEN (286) in Kälberseren nachgewiesen. BERGSTAND und CZAR (29) gelang dann 1956 der Nachweis im fetalen menschlichen Serum. Diese Beobachtungen wurden 1959 von GALDO (102) und 1965 von MASOPUST (230) bestätigt.

1963 konnte von ABELEV (2) ein Anstieg von Serum-AFP bei Mäusen mit transplantierten malignen Lebertumoren gezeigt werden, welches mit dem bei Rindern mit malignen Lebertumoren entdeckten AFP identisch ist.

TATARINOV (369) wies 1964 als erster das AFP im Serum bei einem Patienten mit primärem Lebercarcinom nach und ABELEV et al (3, 4, 231) 1967 auch bei Keimzelltumoren des Hodens und des Ovars (Klassifikation der Keimzelltumoren bei 245, 300).

Während der Schwangerschaft finden sich physiologischerweise regelmäßig erhöhte AFP-Serumspiegel; erhöht sind sie besonders bei fetalen Mißbildungen wie Anenzephalie (48, 49, 50, 198, 199), Spina bifida (50, 389) sowie auch bei RH-immunisierten Schwangeren (334). Die hohe fetale Serum-AFP-Konzentration spiegelt sich während der Schwangerschaft im mütterlichen Serum wieder (126). Die physiologische Bedeutung der hohen fetalen AFP-Serumspiegel ist unbekannt. Einziger Hinweis könnte eine Östrogenbindung durch AFP sein (261, 384, 385), was als mögliche Schutzfunktion für den Feten gegenüber den mütterlichen Östrogenen gedeutet wird (55). Zunächst glaubte man, daß AFP lediglich bis wenige Wochen nach der Geburt im menschlichen Serum vorhanden sei (4). Inzwischen ist AFP auch bei gesunden Erwachsenen, wenn auch nur in geringen Konzentrationen (10-16,5 ng/ml), nachgewiesen (61, 126, 154, 205, 207, 304, 318).

Pathologisch erhöhtes AFP konnte auch in geringem Umfang bei 1 - 3 % verschiedener Malignome des Gastrointestinaltraktes,

sowie gelegentlich bei Lebermetastasen nachgewiesen werden (65, 105, 192, 210, 292, 308).

Für erhöhtes AFP, wie z.B. beim Lebercellcarcinom wurden verschiedene Hypothesen angenommen: Synthesehemmung eines als Repressor agierenden Proteins (124), irreversible Veränderungen der Hepatocyten, Aktivierung stummer Zellklone und Vitamin-B₆-Mangel (4, 5, 172). Andererseits wird hingegen eine Persistenz von Hepatoblasten oder auch das Verbleiben von undifferenzierten Stammzellen vermutet (153, 233).

Circa 70 bis 95 % der Lebercellcarcinome besitzen die Fähigkeit, AFP im Tumorgewebe zu synthetisieren, was schließlich zu einem Anstieg des AFP im Serum sowie gegebenenfalls in Aszites und Pleuraexsudat führt (233, 269, 292, 307, 387). In einer großen Studie der WHO waren von 247 PLC-Fällen 75,2 % Serum-AFP positiv (177).

Die Konzentration des Serum-AFP ist aber bei 10 bis 20 % der Patienten mit malignen Lebertumoren nicht erhöht (105). Bei noch sehr kleinen malignen Lebertumoren und bei ca. 5 bis 15 % von nicht AFP-produzierenden malignen Lebertumoren kann das Serum-AFP normal sein (ca. 10 ng/ml).

Bei AFP-Bestimmungen wegen Verdachts auf malignen Lebertumor liegen die AFP-Befunde bei 95 % über dem Normalbereich (204, 227). Bei primärem Lebercellcarcinom konnte durch den AFP-Nachweis im Serum von ca. 85 % der Patienten bei der ersten Untersuchung die Diagnose eines malignen Lebertumors gestellt werden (392). Daher ist die Bestimmung des Serum-AFP als Screening-Methode zur Frühdiagnose des primären Lebercellcarcinoms empfohlen worden (69, 392).

Eine AFP-Bestimmung scheint auch wichtig bei der Neuentdeckung einer Leberzirrhose oder einer chronisch-entzündlichen Lebererkrankung, vor allem dann, wenn die Patienten über 50 Jahre alt sind (126). In der Tat wurden unter nicht selektierten Patienten, bei denen eine Leberzirrhose neu diagnostiziert wurde,

aufgrund einer initialen AFP-Bestimmung ca. 5 % klinisch nicht vermutete maligne Lebertumoren entdeckt (194, 208, 211).

Bei Erreichen der 2000 ng/ml-Serumkonzentrations-Grenze wird ein hepatocelluläres Carcinom bzw. ein embryonaler Tumor mit Dottersackstrukturen sehr wahrscheinlich (210, 222). Differenzialdiagnostisch beweisend für ein primäres Leberzellcarcinom ist eine Serumkonzentration über 2000 ng/ml, da Erhöhungen von 10 - 2000 ng/ml bei verschiedenen Carcinomen des Gastrointestinaltraktes (in bis zu 50 %) und bei benignen Lebererkrankungen beobachtet wird (3, 10, 15, 35, 101, 148, 200, 201, 209, 210, 232, 246, 257, 304, 323, 344, 350).

Nach POLTERAUER und HORAK sind erst AFP-Serumspiegel über 7500 ng/ml pathognomonisch für ein Leberzellcarcinom (294). Nach GANZ et al (105) deuten, bis auf seltene Ausnahmefälle, bereits Werte über 320 ng/ml immer auf einen malignen Lebertumor oder ein Teratom hin.

Zwischen Tumorgröße und AFP-Serumspiegel besteht nach Ansicht der meisten Autoren kein Zusammenhang (5, 80, 257, 302, 305, 327, 332). Auch bei großen Tumoren ließ sich AFP gelegentlich nur in geringen Mengen (332) oder gar nicht (364) nachweisen.

Die Höhe des AFP-Wertes sagt wenig über die Überlebenszeit bzw. über Tumorgröße und Tumorwachstum aus (74, 105, 160, 203). Im Gegensatz dazu berichten MATSUMOTO et al (235) über eine Korrelation unterschiedlicher AFP-Serumspiegel mit der Überlebenszeit und mit dem Differenzierungsgrad maligner Lebertumoren.

Bei benignen, insbesondere entzündlichen Lebererkrankungen, können transitorisch bzw. periodenweise Serum-AFP-Erhöhungen beobachtet werden, die jedoch nie Werte erreichen, wie sie bei den genannten malignen Tumoren auftreten können (81, 193, 203). Vorübergehend geringe AFP-Erhöhungen werden bei Patienten mit akuter Virushepatitis gefunden (105, 193, 203). Ein transitorischer AFP-Anstieg bei Hepatitiden ist im Zusammenhang mit

der Leberzellregeneration zu sehen, zumal sich dieser zeitlich gut in die Reihenfolge von entzündungsbedingter Nekrose und Regenerationsphase einpaßt (5, 51, 284, 385).

Auch andere maligne Tumoren wie z.B. Mamma-, Prostata-, Bronchial- und Zervixcarcinome können mit erhöhten Werten von AFP einhergehen (259).

Bei endodermalen Sinustumoren konnte ebenfalls ein erhöhter AFP-Serumspiegel nachgewiesen werden (51, 80, 140, 231, 236, 381).

Bei allen anderen Carcinomen sind erhöhte AFP-Werte sehr selten nachzuweisen (237).

Pathologische AFP-Konzentrationen werden auch im Serum von Patienten mit Ataxia teleangiectasia (390) und mit hereditärer Tyrosinämie (27) festgestellt.

2.2 AFP im histologischen Schnitt

2.2.1 AFP-Nachweis in unterschiedlichen Geweben

Das AFP wird beim Menschen physiologischerweise in der fetalen Leber, in der Plazenta, im Dottersack und in geringen Mengen auch in der Mukosa des fetalen Gastrointestinaltraktes gebildet (112).

Die primären Carcinome derjenigen Organe, die während der Fetalzeit die Potenz der AFP-Synthese besitzen, können durch eine Neosynthese in maligne Tumoren nicht nur zu einem Konzentrationsanstieg dieses carcinoembryonalen Proteins im Serum, sondern auch im maligne entarteten Gewebe führen (210).

Mittels Immunfluoreszenz wurde AFP in Leberparenchymzellen des Feten und Neugeborenen (65, 82, 217, 301, 349), in Tumorzellen von Patienten mit primärem Leberzellcarcinom und mit Dottersacktumoren nachgewiesen (83, 84, 258, 291, 301, 365, 366, 370). Man lokalisierte AFP diffus intracytoplasmatisch (63, 83, 84, 255, 257, 291, 301, 364) und beim Leberzellcarcinom,

außerdem noch in der Cytoplasmamembran und in der perinukleären Zone (83, 255, 348). Alle Untersucher fanden es in einem wechselnd großen Teil der Zellen, teilweise auffällig in der Nähe von Blutgefäßen und Kapillaren (123, 348). Dieselben Autoren beobachteten, daß AFP-positive Zellen ein azidophiles granuläres Cytoplasma mit größeren hyperchromen Kernen aufweisen können.

RIOCHE (313) fand AFP in menschlichen malignen Lebertumorzellkulturen und ABELEV (2) in chemisch induzierten malignen Lebertumoren der Maus und Ratte sowie im Serum dieser Tiere.

2.2.2 Nachweis AFP-positiver Tumorzellen im primären Lebercarcinom

In unserer Studie entdeckten wir AFP-positive Tumorzellen in 14 Fällen (17 %) von 82 PLC. AFP fanden wir in 13 (19 %) der HCC-Fälle (n = 70). Dabei war das AFP im Cytoplasma überwiegend diffus verteilt (Abb. 8, 9, 10). AFP ist damit nach α_1 AT das zweithäufigste Antigen in den Tumorzellen von HCC. Dies wurde auch von THUNG et al (375) erwähnt.

Die Angaben über AFP-positive Tumorzellen sind in der Literatur unterschiedlich. URIEL et al (383, 384, 386) konnten weder in malignen noch normalen Hepatocyten AFP nachweisen. Allerdings benutzten sie eine indirekte Methode, die die östrophile Eigenschaft des AFP durch Zellaффinitätsmessungen mit Tritium-markierten Östrogenen bestimmt. CREMER (73) berichtet, daß es ihm nur in einem Fall von 23 Fällen primärer Lebercellcarcinome gelungen sei, AFP im Tumorgewebe immunhistochemisch nachzuweisen. Dagegen fanden THUNG et al (375) AFP-positive Tumorzellen in ca. 35 % und KOJIRO et al (178) sogar in ca. 72 % der HCC-Fälle. Ob diese unterschiedlichen Ergebnisse methodisch bedingt sind oder ob es sich um geographische Besonderheiten handelt, ist nicht zu entscheiden.

Im Serum werden in 70 - 90 % der HCC-Fälle erhöhte AFP-Werte gemessen (233, 269, 292, 307, 387). Dies könnte bedeuten, daß wesentlich mehr Leberzellcarcinome AFP sezernieren, ohne das es immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Möglicherweise wird dabei nicht genügend AFP im Cytoplasma der Tumorzellen gespeichert und ist damit nicht faßbar.

Cholangiocarcinome und sekundäre Lebertumoren besitzen die Fähigkeit der AFP-Bildung im allgemeinen nicht (118, 210). Auch wir konnten in keinem Fall von reinem Cholangiocarcinom AFP nachweisen. Allerdings fanden wir in einem Fall von kombiniertem PLC AFP-positive Tumorzellen sowohl im HCC als auch im Cholangiocarcinom.

Zehn der 14 AFP-positiven Fälle in unserer Untersuchung waren mit Zirrhose verbunden.

2.2.3 Die %-Verteilung der AFP-positiven Zellen im Tumorgewebe primärer Lebercarcinome

Die Verteilung der AFP-positiven Zellen im Tumorgewebe der HCC-Fälle lag in vier Fällen unter 10 % der Tumorzellen, in sechs Fällen zwischen 10 und 50 % und in 3 Fällen bei über 50 %.

Das kombinierte PLC zeigte im HCC eine Verteilung von 10 bis 50 % und im Cholangiocarcinom von unter 10 %.

In keinem Fall von reinem Cholangiocarcinom konnten wir AFP nachweisen.

NISHIOKA (255, 257) beobachtete in malignen Lebertumorpräparaten AFP-haltige Zellen gleichmäßig verteilt mit einer Häufigkeit der Tumorzellen von 20 %.

2.2.4 Kombiniertes Auftreten AFP-positiver Tumorzellen mit anderen Antigenen

KOJIRO et al (178) fanden in ihrer Studie über HCC in 72 % AFP-positive Zellen und in 98 % Albumin-positive Zellen. Im größten Teil des Tumorgewebes scheint eine reziproke Beziehung zwischen der Anzahl der AFP-positiven Zellen und der Anzahl der Albumin-positiven Zellen zu bestehen. Sie ziehen daraus den Schluß, daß die meisten HCC-Zellen nur eins der beiden untersuchten Antigene produziert. AFP-positive Zellen entdeckten sie nur im Tumorgewebe, während die Albumin-positiven Zellen auch im normalen oder zirrhotischen Lebergewebe gefunden wurden.

Dies steht im Gegensatz zu der Meinung anderer Autoren (76, 283, 311, 375), die aufgrund des kombinierten Auftretens zwei oder mehr Antigene in HCC-Zellen auf die Heterogenität dieser Zellen hinweisen.

In unserer Untersuchung waren 11 (79 %) der 14 AFP-positiven PLC-Fälle im Tumorgewebe mit anderen Antigenen kombiniert. Zehn Fälle davon sind HCC, kombiniert in vier Fällen mit a_1AT , in zwei Fällen mit CEA, in zwei Fällen mit CEA und a_1AT sowie in zwei Fällen mit a_1AT und HBsAg im Lebergewebe. Das bedeutet, daß in 14 % ($n = 10$) der 70 HCC-Fälle AFP in Kombination mit anderen Antigenen, überwiegend mit a_1AT , aufgetreten ist. Dies bestätigt die Aussage von THUNG et al (375), daß a_1AT am häufigsten mit AFP zusammen auftritt.

Eins der 14 AFP-positiven PLC ist ein kombiniertes PLC. Im HCC-Anteil ist AFP mit CEA und im Cholangiocarcinom-Anteil mit CEA und a_1AT kombiniert.

2.2.5 Nachweis AFP-positiver Zellen im nicht tumorösen Lebergewebe bei primären Lebercarcinomen

Wir konnten in keinem unserer 82 PLC-Fälle AFP im nicht tumorösen Lebergewebe nachweisen. Auch URIEL et al (383, 384, 386) fanden AFP bei malignen Lebertumoren weder in malignen noch normalen Hepatocyten. Dagegen fanden sie es in sog. Übergangszellen (kleine runde bis ovale Zellen mit elongiertem oder nierenförmigem Nukleolus), die an der normalen Leberregeneration teilnehmen, in 1-2 % der gesamten Leberzellpopulation. Daraus ziehen die Autoren den Schluß, daß AFP nur im Übergangsstadium der Leberzelldifferenzierung produziert und sezerniert wird.

PEYROL et al (291) stellen die Hypothese auf, daß die Produktion von AFP eine vorübergehende Entwicklung ist, die entweder während der Entdifferenzierung von malignen Lebertumorzellen oder bei der Entdifferenzierung von Hepatocyten in einen proliferierenden Prozeß auftritt.

Demgegenüber gelang es THUNG et al (375), in elf von 37 HCC AFP auch im nicht tumorösen Lebergewebe nachzuweisen.

2.2.6 Korrelation zwischen AFP-Nachweis im Lebergewebe und AFP-Serumspiegel

Nach LAMERZ (194) besteht möglicherweise eine Korrelation zwischen AFP-Konzentration in Tumorgewebe und Serum, während GANZ et al (105) und ALPERT (20) keinen Zusammenhang zwischen Serum und Ausfall der immunhistochemischen Reaktion sehen. KOJIRO et al (178) berichten, daß die Anzahl der AFP-positiven Zellen und die Intensität der Immunperoxidase-Reaktion ungefähr proportional zu den AFP-Serumspiegeln ist.

Bei unseren acht chirurgischen HCC-Fällen war es möglich, den AFP-Serumspiegel zu bestimmen. Fünf dieser Fälle sind seronegativ und drei seropositiv.

Einer der drei seropositiven Fälle ist bei einem AFP-Serumwert von 2200 ng/ml im Tumorgewebe AFP-negativ, sowie auch HBsAg-seronegativ. Der zweite Fall ist bei einem AFP-Spiegel von 2300 ng/ml im Tumorgewebe zwischen 10 und 50 % AFP-positiv, im Serum HBsAg-negativ. Der dritte seropositive Fall ist bei einem signifikant erhöhten AFP-Serumwert von 48.000 ng/ml in über 50 % im Tumorgewebe AFP-positiv und außerdem HBsAg-seropositiv. Eine sichere Aussage ist jedoch nicht möglich, obwohl der Fall mit dem höchsten Serumwert die meisten AFP-markierten Tumorzellen aufweist.

2.2.7 Korrelation unterschiedlicher AFP-Serumspiegel mit dem Differenzierungsgrad des PLC

Unsere drei AFP-seropositive HCC-Fälle zeigen keine unterschiedliche Differenzierung, bezogen auf unterschiedliche AFP-Serumwerte.

MATSUMOTO et al (235) unternahmen den Versuch, Patienten mit malignen Lebertumoren aufgrund von unterschiedlichen AFP-Serumspiegeln in 3 Hauptgruppen zu unterteilen. Sie berichten von einer Korrelation der unterschiedlichen AFP-Serumspiegel mit dem Differenzierungsgrad des Tumors und mit der Überlebenszeit. Die Gruppe A hat AFP-Serumspiegel von > 10.000 ng/ml, eine Überlebenszeit von 7.62 ± 3.97 Monaten und histologisch ein gering differenziertes Carcinom. Die Gruppe B hat AFP-Serumspiegel von 200 bis 10.000 ng/ml, eine Überlebenszeit von 16.18 ± 12.18 Monaten und histologisch ein mäßig differenziertes Carcinom. Die Gruppe C hat AFP-Serumspiegel < 200 ng/ml, eine Überlebenszeit einmal von 33.92 ± 28.22 Monaten mit sehr unterschiedlich differenzierten Carcinomen und von 3.75 ± 0.87 Monaten bei histologisch anaplastischem Carcinom.

Von einigen Autoren wurde AFP vermehrt gefunden bei der Zunahme der Entdifferenzierung des primären Lebercarcinoms im histologischen Bild (19, 235, 302, 327, 332, 342, 364), wobei eine mäßige bis leichte Entdifferenzierung die höchsten AFP-

Spiegel zeigte. Von anderen Autoren konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden (80, 257), d.h. der Grad der Malignität des Tumors hat keinen Einfluß auf die AFP-Synthese (321).

3. α_1 AT-Nachweis

3.1 α_1 AT im Serum

Das α_1 AT wird normalerweise im Serum in einer Konzentration von 200-300 mg% gefunden, das sind 4 % der Serumproteine und ca. 90 % der α_1 -Globuline (90). Es stellt aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes den Proteasehemmer mit der höchsten molaren Konzentration im Serum und in der interstitiellen Flüssigkeit dar (90).

Bei homozygot normaler (MM) Genanlage beträgt die α_1 AT-Serumkonzentration 100 %.

Nach FAGERHOL (95) haben Untersuchungen von Familien mit α_1 AT-Mangel gezeigt, daß sich die α_1 AT-Serumkonzentration in verschiedenen Größenordnungen bewegt: Bei heterozygoter (Z) Genanlage liegt die Konzentration bei 40-60 % der Norm und bei homozygot defekter (ZZ) unter 20 %. Heterozygote Individuen haben scheinbar keine klinische oder biochemische Manifestation der Lebererkrankung (97).

Da α_1 AT als Protein der akuten Phase bei Infektionen, Gravidität und vielen anderen Streß-Situationen erhöht im Serum gefunden wird, ist bei einem einmaligen Normalwert ein partieller Mangel noch nicht auszuschließen (274). Auf diese Weise kann der α_1 AT-Wert im Normbereich liegen, obwohl ein heterozygoter Mangel vorliegt. Bei einem vermuteten Mangel und für wissenschaftliche Fragestellungen ist deshalb die Bestimmung des Phänotyps der heute bekannten 25 Allele nötig (274).

Entgegen führerer Ansicht ist offenbar auch bei homozygoten Trägern des Defekt-Allels PiZZ eine zeitweilige Steigerung der Serumkonzentration bis über 100 mg% möglich (274).

KUEPPERS (184) erzielte eine Erhöhung der α_1 AT-Serumkonzentration durch eine Typhus-Vaccine-Injektion.

Bei anhaltend verminderter Serum- und Gewebskonzentration durch eine kodominant vererbte Synthesestörung kommt es bei Erwachsenen vorwiegend zu progredientem Emphysem, während sich im Säuglings- und Kleinkindesalter in mehr als der Hälfte der Fälle Lebermanifestationen einstellen (274). Weitere Organsysteme scheinen nur in seltenen Fällen Schäden zu erleiden, die auf den ATM bezogen werden können. In Zusammenhang damit wurden die Membranoproliferative Glomerulonephritis (238, 243), die lokale Fibrose (282), die chronische Polyarthrit (46) und Magen-Duodenalulzera (21, 33) gebracht. Auch beim Icterus prolongatus neonatorum wurde ein Zusammenhang vermutet (163). Im pädiatrischen Krankengut spielt der ATM vor allem in Zusammenhang mit der Neugeborenenhepatitis eine erhebliche Rolle (274).

3.2 α_1 AT im histologischen Schnitt

3.2.1 α_1 AT-Nachweis im Lebergewebe bei α_1 AT-Mangel und in anderen Geweben

Bei Erwachsenen, ebenso wie bei Kindern mit α_1 AT-Mangel (ATM) ist die wichtigste Abnormität das Vorkommen von Ablagerungen innerhalb parenchymaler Leberzellen. Diese Ablagerungen wurden erstmals 1971 von SHARP (337) notiert. Mittels der Immunhistochemie läßt sich gewöhnlich bei gesunden Individuen im normalen Lebergewebe kein α_1 AT nachweisen, jedoch findet man es globulär in den Hepatocyten bei Trägern des Z-Genes für α_1 AT (PiZZ oder PiMZ) und ist ein deutlicher Marker eines erheblichen AT-Mangels (150, 281, 337). Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten die Ablagerungen als Kügelchen innerhalb des Cytoplasmas in einer unterschiedlichen Anzahl von Hepatocyten (337). Sie können in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung beobachtet werden; sind aber mit der PAS-Färbung oder der Immunfluoreszenz-Methode besser zu erkennen (337). Sie fallen in der PAS-Färbung leuchtend rot auf (164).

Die Anzahl und Gestalt der Kügelchen in jedem Hepatocyten variieren von einer Zelle zur anderen (76, 121, 142, 152). Wenn der Aufbau der Leber erhalten ist, scheinen die Einschlüsse enthaltenden Zellen wahllos innerhalb der Leberläppchen verteilt zu sein (121, 213). Einige Areale des Lebergewebes zeigen jedoch keine globulären, intracytoplasmatischen Einschlüsse (121).

Eine spezifische lobuläre Lokalisation der positiven Zellen ist nicht vorhanden, obwohl sie häufig herdförmig periportal und in der Nähe von Lebervenen, sowie nekrotischen Bezirken gefunden werden (121, 213). Aufgrund ihrer ungleichmäßigen Verteilung, ist der Prozentsatz der Einschlüsse enthaltenden Zellen schwer zu bestimmen (97). AAGENAES et al (1) schätzten, daß 20-60 % der Hepatocyten diese Einschlüsse enthalten.

In einigen Fällen waren Galle-Thromben innerhalb der Leberzellen zu erkennen (1, 113, 378) und bei Zirrhose konnte man eine Gallengangsproliferation (1, 25, 113, 127, 295, 338) beobachten. Bei Zirrhose oder portaler Fibrose sind sie vermehrt an den kollagenen Septen zu beobachten (1, 25, 28, 76, 113, 152, 337, 338).

SHARP (337) zeigte elektronenmikroskopisch, daß die Kügelchen enthaltenden Zellen Abnormitäten des endoplasmatischen Retikulums aufweisen. Die intracytoplasmatischen Einschlüsse sind globulär oder oval und 0,5 - 1 bis 39 - 40 μ m im Diameter (28, 76, 121, 164), die größeren Einschlüsse sind seltener zu sehen (28).

Es handelte sich bei den Einschußkörpern um elektronendichtes Material in den unterschiedlich weit dilatierten Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (164). In den kleinen Zisternen erscheint es flockig und aufgelockert, in den großen kompakt und homogen (164). Manche Autoren (1, 89, 336, 399) gehen davon aus, daß die α_1 AT-haltigen Einschlüsse bei homozygoten Merkmalsträgern von PiZ reichlicher, größer und stärker als bei heterozygoten im glatten und rauhen endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen nachweisbar sind. Diese Einschlüsse enthalten keine Sialsäure (399). Vermutlich ist dies auf punk-

tuelle Veränderungen der Aminosäuresequenz zurückzuführen, die für PiZ und PiS bereits definiert werden konnten (157, 275). In dieser Form kann das Molekül offenbar schlechter aus den Hepatocyten ausgeschleust werden, so daß daraus der erniedrigte Serumspiegel resultiert (244, 274, 337).

Die morphologische Diagnose eines angeborenen ATM ist nur durch den Nachweis dieser diastaseresistenten PAS-positiven globulären Einschlüssen in den Hepatocyten möglich (121, 337). Sie treten, abgesehen von wenigen Ausnahmen (47, 99), nur bei Trägern des PiZ-Allels auf (88), und zwar sowohl bei Homo- als auch bei Heterozygotie. Die globulären Einschlüsse bestehen aus Ansammlungen der Z-Variante ("Z-Protein") des α_1 AT (88, 158). Die Z-Variante staut sich, infolge einer Störung des intrazellulären Transportes in den erweiterten Zisternen des endoplasmatischen Retikulums an und weist trotz unterschiedlicher Molekularstruktur die immunhistochemischen Eigenschaften der "normalen M-Variante" des α_1 AT auf (244, 337). Dadurch ist eine sichere Abgrenzung von anderen diastaseresistenten PAS-positiven Einschlüssen in den Leberzellen gegeben (337).

Die Rolle der charakteristischen hepatocytären PAS-positiven, diastaseresistenten Globula ist ungeklärt (164). Das Protein in den Globula ist mit dem Serum- α_1 AT immunologisch identisch (121, 158). Es unterscheidet sich jedoch hiervon chemisch durch einen geringeren Kohlenhydratanteil, das Nichtvorhandensein von Sialsäure und die fehlende Hemmung von Proteasen (121). Diese Globula werden jedoch auch bei Patienten ohne histologischen Nachweis einer Leberläsion gefunden (121, 212).

Nach TOTOVIC und KRON (378) lassen sich mit der Diastase-PAS-Reaktion Einschußkörper (z.B. Mallory-Körperchen und Megamitochondrien), die Diastase-PAS-negativ sind, relativ leicht von den diastaseresistenten PAS-positiven AT-haltigen Einschlüssen abgrenzen. Die intrahepatocytären Ablagerungen von Pigmentgranula, die ebenfalls diastaseresistent und PAS-positiv sein können, lassen sich sowohl nach ihrer Größe als auch nach

ihrer Eigenfarbe und ihrem färberischen Verhalten leicht von α_1 AT-haltigen Einschlüssen unterscheiden (378). Etwas schwieriger kann die Abgrenzung von granulären Gallepigmentablagerungen in periportal gelegenen Hepatocyten sein, die sich manchmal bei der Diastase-PAS-Reaktion rötlich anfärben (378).

α_1 AT wird aber außerdem in malignen Hepatocyten (277, 279), in einigen Keimdrüsentumoren sowie entodermalen Sinustumoren (278), verschiedenen Hirntumoren (139), Lungen-, Brust- und Colonicarcinomen (92) produziert.

3.2.2 α_1 AT-Nachweis bei primären Lebercarcinomen in Korrelation zum α_1 AT-Mangel

PALMER et al (283) folgern, aufgrund ihrer Untersuchungen, daß die Präsenz von mindestens einem Z-Allel im Serum- α_1 AT klar in Korrelation mit dem Vorkommen von malignen Lebertumoren steht, vermutlich sogar kausal. Sie (286) berichten von globulären Einschlüssen in Zellen von malignen Lebertumoren bei Patienten mit Z-Gen. Die α_1 AT-Einschlüsse in den Tumorzellen können genetisch bestimmt werden, wenn sie mit Z-Genen verbunden sind (311).

α_1 AT-Kügelchen wurden bei malignen Lebertumor-Patienten mit ATM einmal nur in normalen Leberzellen (28, 87) und zum anderen gleichzeitig in Tumorzellen und normalen Leberzellen beobachtet (215, 359).

PALMER und WOLFE (277) demonstrierten globuläre α_1 AT-Ablagerungen in malignen Lebertumoren, sowohl in hepatocellulären Carcinomen als auch in cholangiocellulären Carcinomen. Es ist denkbar, daß das HCC globuläre α_1 AT-Einschlüsse produziert (277). Es ist überraschend, daß cholangiocelluläre Carcinomzellen α_1 AT enthalten. Doch REINTOFT und HAGERSTRAND (311) fanden die Einschlüsse auch im Cholangiocarcinom, sowie im HCC und Hepatoblastom. Es bestand keine Korrelation zwischen der Differenzierung des Tumors und der Positivität für α_1 AT (311). Auch wir konnten in drei Cholangiocarcinomen α_1 AT im Tumorge-

webe nachweisen.

In unserer Studie sind 28 (34 %) der 82 PLC-Fälle α_1 AT-positiv. Sie teilen sich auf in 24 (34 %) HCC-Fälle, in 3 Cholangiocarcinome und in ein kombiniertes PLC. Wir fanden es teils globulär, feingranulär oder diffus in den Tumorzellen (Abb. 12). In keinem unserer Fälle ist bekannt, ob bei den Patienten ein α_1 AT-Mangel nachgewiesen wurde. Einundzwanzig dieser α_1 AT-positiven Fälle sind mit Zirrhose verbunden.

In einer Studie von REINTOFT und HAGERSTRAND (311) über 69 primäre Lebercarcinome waren ca. 40 % im Cytoplasma granulär bis globulär α_1 AT-positiv. Wir liegen mit 34 % in unserer Untersuchung bei etwa der gleichen Größenordnung.

α_1 AT war der am häufigsten auftretende Marker in unseren HCC-Fällen. Dies bestätigt die Aussage anderer Autoren (311, 375). Die Häufigkeitsangaben sind sehr unterschiedlich, sie liegen zwischen ca. 50 und 90 % (276, 279, 283, 375). Die höchste Frequenz war in oral-kontrazeptiv-assoziierten HCC zu sehen (279, 283). In dieser Studie hatten die Patienten keinen ATM, welcher im Zusammenhang mit HCC steht.

TOTOVIC und KRON (378) fanden bei drei immunhistochemisch untersuchten primären Lebercarcinomen ATM-spezifische Einschlüsse nur in den Hepatocyten, nicht aber in den Tumorzellen. Auch KELLY et al (165) konnten in keinem von 42 HCC den Beweis von α_1 AT in Tumorzellen erbringen. Dies steht im Gegensatz zu anderen histologischen Studien (34, 277), bestätigt jedoch die Arbeit von THEODOROPOULOS (373) und PETER (289).

Für das Auftreten α_1 AT-positiver Globule sowohl in Hepatocyten als auch in Tumorzellen von HCC wird ein Sekretionsdefekt postuliert (244).

Eine besondere Bedeutung kommt der Immunperoxidase-methode beim Nachweis von α_1 AT-haltigen Einschlüssen in Leber- und Dottersacktumoren zu (378), die nach PALMER et al (277, 283) auch oh-

ne einen ATM in Tumorzellen - möglicherweise als sog. "tumor-markierende Proteine" - auftreten.

Aus der Studie PALMERS et al (283) geht hervor, daß die malignen Lebertumoreinschlüsse, im Vergleich zu den α_1 AT-Mangel-Einschlüssen, einen größeren Umfang und größere Unterschiede in der Gestalt (manchmal mehr oval als rund) zeigen und eine Verbreitung nur im neoplastischen Gewebe, intra- und extrazellulär, zu finden ist. Einige intrazelluläre α_1 AT-Tumoreinschlüsse, in dem untersuchten Fall, waren von einem sog. "Hof" umgeben (283).

Nach KELLY et al (165) sollten nur die globulären α_1 AT-Einschlüsse, nicht jedoch feingranuläre und diffuse, die auch PALMER et al (279) beschreibt, als Hinweis auf α_1 AT-Mangel berücksichtigt werden.

3.2.3 %-Verteilung der α_1 AT-positiven Zellen im Tumorgewebe primärer Lebercarcinome

Die Verteilung der α_1 AT-positiven Zellen im Tumorgewebe der HCC-Fälle lag in dreizehn Fällen unter 10 % der Tumorzellen, in neun Fällen zwischen 10 und 50 % und in zwei Fällen bei über 50 %.

Die Häufigkeitsverteilung bei den drei positiven Cholangiocarcinomen lag beim ersten Fall unter 10, beim zweiten zwischen 10 und 50 % und beim dritten über 50 %.

Das kombinierte PLC zeigt nur im Cholangiocarcinom-Anteil zwischen 10 und 50 % α_1 AT-positive Tumorzellen, der HCC-Anteil ist negativ.

3.2.4 Kombiniertes Auftreten a_1 AT-positiver Tumorzellen mit anderen Antigenen

In unseren Fällen ist a_1 AT in 14 (50 %) von 28 a_1 AT-positiven PLC-Fällen im Tumorgewebe mit anderen Antigenen kombiniert.

In einem Fall handelt es sich um ein Cholangiocarcinom in dem a_1 AT mit CEA kombiniert ist. Ein anderer Fall ist ein kombiniertes PLC, in welchem a_1 AT und CEA im HCC-Anteil und im Cholangiocarcinom-Anteil mit AFP und CEA zusammentreffen.

Zwölf Fälle sind Hepatocelluläre Carcinome. a_1 AT war kombiniert in vier Fällen mit AFP, in drei Fällen mit CEA, in zwei Fällen mit AFP und CEA, in zwei Fällen mit AFP und HBSAg im Lebergewebe und in einem Fall nur mit HBSAg im Lebergewebe. Das bedeutet, daß in 17 % ($n = 12$) der 70 HCC-Fälle a_1 AT in Kombination mit anderen Antigenen, am häufigsten mit AFP, aufgetreten ist. Dies entspricht auch den Angaben von THUNG et al (375). a_1 AT ist damit nicht nur der am häufigsten auftretende Marker in HCC-Zellen, sondern auch der am häufigsten in Kombination mit anderen Antigenen auftretende Marker in diesen Zellen.

Nicht nur THUNG et al (375), sondern auch PALMER et al (283) berichten von der Heterogenität der HCC-Zellen und ihrer Einschlüsse, die in a_1 AT-Mangel-Einschlüssen nicht beobachtet werden konnte. Die Proportionen der durch Immunfluoreszenz nachgewiesenen Tumoreinschlüsse lagen, in einem untersuchten Fall, ungefähr bei 80 - 90 % für a_1 AT und für AFP und α_2 -Makroglobulin bei ca. 50 %. Die Tatsache, daß diese Anteile mehr als 100 % ergeben, zeigt an, daß einige dieser Einschlüsse mehr als eines dieser Proteine enthalten muß (283). Diese Beobachtung wurde schon 1972 von DE LELLIS et al (76) gemacht, die annehmen, daß sich nur der äußere Rand der globulären Einschlüsse antigenetisch mit a_1 AT gleicht.

Auch REINTOFT et al (311) beschreiben drei maligne Lebertumorfälle, bei denen a_1 AT- und AFP-Einschlüsse in Tumorzellen nachgewiesen wurden, ohne die klassischen a_1 AT-Kügelchen im

angrenzenden nicht tumorösen Gewebe zu finden.

3.2.5 Nachweis α_1 AT-positiver Zellen im nicht tumorösen Lebergewebe bei primären Lebercarcinomen

Wir fanden von 82 PLC in drei Fällen (4 %) von HCC (n = 70) globuläre α_1 AT-Einschlüsse im nicht tumorösen Lebergewebe. Die Häufigkeitsverteilung lag im ersten Fall unter 10 %, im zweiten über 50 % und im dritten Fall unter 10 %, kombiniert mit α_1 AT im Tumorgewebe mit einer Verteilung von 10 - 50 %.

α_1 AT fanden wir bei keinem der Cholangiocarcinome im nicht tumorösen Lebergewebe.

Bei keinem der Fälle konnte geklärt werden, ob bei den Patienten ein ATM bestand.

In einigen Fällen fanden wir im Lebergewebe eine diffuse Reaktion im Cytoplasma der Leberzellen, die teils in periportalen Hepatocyten auftrat, in seltenen Fällen eine feingranuläre Reaktion (Abb. 11), welche jedoch nicht als Hinweis auf einen α_1 AT-Mangel berücksichtigt werden sollte, da wir diese eher als Ausdruck einer normalen oder gesteigerten Synthese betrachten und nicht als pathologische Speicherung bei Ausscheidungsdefekt.

Auch THUNG et al (375) fanden in ihrer Studie in 22 Fällen von 37 HCC α_1 AT-Einschlüsse im nicht tumorösen Lebergewebe.

TOTOVIC und KRON (378) gelang der Nachweis von ATM-spezifischen Einschlüssen in Hepatocyten in allen 10 retrospektiv erfaßten Fällen des ATM bei Zirrhosen, wobei neben der Zirrhose in 3 Fällen auch ein hepatocelluläres Carcinom und in 6 Fällen auch ein Lungenemphysem vorhanden war. Die Einschlüsse fanden sich in den 3 immunhistochemisch untersuchten primären Lebercarcinomen nur in den Leberzellen, nicht aber in den Tumorzellen (378). In allen Fällen fiel die Immunperoxidase-reaktion eindeutig positiv aus. Dies war durch Ablagerung von intensiv

dunkelbraun gefärbten, meistens granulären bzw. globulären, seltener von diffus verteilten Reaktionsprodukten in Hepatocyten, vornehmlich an der Peripherie der Läppchen oder der Regeneratknotten erkennbar (378). Bei größeren Einschlüssen war die Reaktion am Rande der Einschlüsse stärker ausgeprägt als in ihrem Zentrum. Dies bestätigt die Beobachtung anderer Autoren (76, 96).

KELLY et al (165) fanden von 42 HCC nur in 2 Fällen periportal typische globuläre α_1 AT-Einschlüsse im nicht neoplastischen Gewebe und eine von 98 Kontroll-Lebern enthielt α_1 AT-Kugeln. Die Differenz zwischen den HCC und der Kontrollserie ist statistisch ohne Signifikanz, da sich die Häufigkeit von α_1 AT-Kügelchen in Kontrollen nicht wesentlich von der erwarteten Häufigkeit von 3,2 % unterscheidet (68, 107). In keinem Fall gab es den Beweis von α_1 AT in Tumorzellen.

4. HBsAg-Nachweis

4.1 HBsAg im Serum

Das von BLUMBERG (37) im Jahre 1965 entdeckte HBsAg ist für die Serumhepatitis bzw. die durch das Virus B hervorgerufene Hepatitis spezifisch (180). Bei der Hepatitis B bedingt der komplexe Aufbau des Virus komplizierte serologische Reaktionen (109). Fast unabhängig von BLUMBERG fanden PRINCE et al (296) und OKOCHI et al (268), daß das HBsAg bereits im Inkubationsstadium der akuten Virushepatitis gefunden wird. Da das HBsAg bereits zu Beginn der akuten Erkrankung rasch eliminiert wird, wird im weiteren Verlauf das Serum wieder HBsAg-negativ (70, 71, 341, 396). Das HBsAg ist nicht nur im Serum, sondern am Ende der Inkubationszeit auch in Urin, Stuhl, Galle, Magensaft, Speichel, Schweiß, Sperma und Muttermilch nachweisbar (109, 330, 331).

Bei mindestens der Hälfte aller akuten Hepatitisserkrankungen ist im Serum HBsAg zu finden (161, 343).

Von Wichtigkeit ist vor allem die Persistenz des HBsAg, da es sich zwar nicht um das eigentliche infektiöse Agens handelt, jedoch ein wichtiges Kennzeichne potentieller Infektiosität darstellt und einen protrahierten Verlauf mit dem Übergang in eine chronische Lebererkrankung erwarten läßt (109). Verschiedene Untersuchungen, ob und wie die Persistenz des HBsAg sich auf die Funktion oder die Morphologie der Leber auswirkt, erbrachten bisher widersprüchliche Meinungen (345, 267, 297, 298). Es ist bislang ungeklärt, wie das Virus selektiv mit den Hepatocyten reagiert (109).

Ein weiteres Problem stellen die gesunden sogenannten HBsAg-Träger (0,8 - 1 % der gesamten Bevölkerung) dar, bei denen häufig keine Hepatitis auszumachen ist (31, 75, 314), die aber eine ständige Gefahr für Neuinfektionen sind.

4.1.1 Korrelation zwischen HBV-Infektion, HBsAg im Serum, Zirrhose und Hepatocellulärem Carcinom

Eine ätiologische Verbindung zwischen chronischer HBV-Infektion und HCC scheint in Afrika und Asien, wo die HBV-Träger-Rate unter der allgemeinen Bevölkerung und das Auftreten von HCC recht hoch ist, weitverbreitet zu sein (38, 151, 272, 333). Die Verbindung wird in Europa und den USA geringer eingeschätzt (39, 40, 272, 329, 377).

TRICHOPOULOS weist in seiner Studie (380) daraufhin, daß eine starke Verbindung zwischen HBV und HCC nicht nur in Asien und Afrika, sondern auch bei griechischen Patienten und bei griechischem Wohnort besteht. Ob die Griechen wirklich repräsentativ für weiße Europäer sind, ist anzuzweifeln, da die Studie von KAKAKI (162) mit 55696 Blutspendern in Europa die höchste HBsAg-positive-Rate (6,4 %) in Griechenland zeigte. Die HBsAg-Träger-Rate in Griechenland ist somit fast vergleichbar mit der in Asien und in einigen Gebieten Afrikas. In London, Amsterdam und Frankfurt liegt die HBsAg-positive-Rate zwischen 0,7 und 0,3 % (272).

Es muß betont werden, daß es in Griechenland, ebenso wie in Ägypten, zwar eine hohe HBV-Infektionsrate gibt, das Auftreten von HCC dagegen eher ungewöhnlich ist (134, 347).

Die Richtigkeit dieser internationalen Wechselbeziehung ist fraglich (133) aufgrund schlechter Qualität der existierenden epidemiologischen Unterlagen, fehlender Differenzierungen zwischen HCC und anderen PLC, unterschiedlicher Völker und ihrer ökologischen Bedingungen, sowie verschiedener Methoden zur HBsAg-Erkennung usw. (195).

OHAKI et al (263) weist auf die Beziehung zwischen HBV und HCC auch bei Kindern hin.

In der großen Mehrheit serologischer Studien (167, 224, 250, 290, 358, 363, 367, 376, 380) war die Verbreitung von HBsAg bei HCC wesentlich höher angegeben als in Kontrollen und in einigen Ländern wurde sie sogar mit 80 - 90 % beziffert. Einige Autoren weisen daraufhin, daß in HCC, nicht jedoch in Cholangiocarcinomen, HBV-Infektionsmarker wesentlich häufiger sind als in entsprechenden Kontrollen (134, 290, 298, 354, 358, 380).

OKUDA (269) berichtet, daß in 40 % der Fälle von hepatocellulärem Carcinom und in 14 % der Fälle von cholangiocellulärem Carcinom das Serum-HBsAg positiv war.

Zirrhose kommt bei zwei Drittel der HBsAg-positiven HCC vor (135). Es scheint, daß die Verbindung zwischen HBV-Infektion und HCC bei Patienten mit Zirrhose ausgeprägter ist als bei Patienten ohne Zirrhose (8, 168, 226, 234, 299, 380). TRICHOPOULOS (380) ist der Ansicht, daß die HBV-Infektion die größte ätiologische Rolle bei HCC, verbunden mit Zirrhose, spielt. Sie wird definitiv als signifikanter Risikofaktor des HCC bezeichnet (135).

Nach OMATA et al (271) ist wahrscheinlich die Alkohol-Zirrhose der häufigste ätiologische Faktor des HCC in den USA und West-Europa.

4.1.2 Korrelation zwischen HBsAg im Serum und AFP-Serumspiegel

KUBO et al (182, 183) weisen auf eine mögliche Wechselbeziehung zwischen HBsAg und AFP-Serumspiegel hin. Sie fanden HBsAg weniger häufig bei Patienten mit hohem AFP-Spiegel. Von einigen Autoren wurde bei AFP-positiven HCC gehäuft HBsAg nachgewiesen (144, 256, 309, 342, 388). Nach anderen Autoren jedoch besteht keine Korrelation zwischen HBsAg-Nachweis bei HCC und dem Vorkommen von AFP (10, 62, 106, 323, 344, 351).

Von unseren drei AFP-seropositiven chirurgischen HCC-Fällen waren zwei HBsAg-negativ im Serum. Jedoch war der dritte Fall bei einem AFP-Serumwert von 48.000 ng/ml HBsAg-seropositiv, was der Aussage von KUBO et al (182, 183) widersprechen würde. Eine sichere Aussage ist aufgrund der geringen Anzahl jedoch nicht möglich.

4.2 HBsAg im histologischen Schnitt

4.2.1 HBsAg-Nachweis bei HBV-Infektion und Hepatocellulärem Carcinom

Die aktive HBV-Infektion ist gekennzeichnet durch das Auftreten von HBsAg nicht nur im Serum, sondern auch in der Leber, sowie durch HBsAg in der Leber und hohe anti-HBc-Titer im Serum (135). In der Praxis scheint das HBsAg der empfindlichste und der am leichtesten zu erkennende Marker zu sein (135). Man fand heraus, daß Patienten mit chronischer HBV-Infektion charakteristische Hepatocyten, sogenannte "ground-glass-cells", aufweisen (130). Diese Zellen haben reichlich zentrozelluläres HBsAg, wenig oder gar kein HBcAg und ein vermehrtes glattes endoplasmatisches Retikulum (128). Sie scheinen sich auch von normalen Hepatocyten zu unterscheiden, hinsichtlich ihrer Produktionskapazität und Ausscheidung verschiedener Proteine (135, 375).

Vorkommen und Lokalisation von HBsAg im Cytoplasma von Hepatocyten wurden von mehreren Autoren beschrieben (9, 14, 72, 78, 253, 260). HBsAg wurde mit der Orcein-Färbung (67, 179, 367), mit der Immunfluoreszenz (11, 42, 251) und mit der Immunperoxidase-Technik (11) lokalisiert.

Das hepatocelluläre Carcinom (HCC) ist imstande, außer CEA, α_1 AT und AFP auch HBsAg zu produzieren (67, 169, 250, 375, 251, 352, 382). Die früheren Studien über HBsAg und HBcAg in der Leber (62, 132, 247) zeigten klar, daß diese zwei HBV-

Antigene deutlich in nicht malignen Gebieten erkannt werden, aber im malignen Lebergewebe fehlen. Dies bestätigen auch elektronenmikroskopische Beobachtungen (131). Weitere Forschungen (151, 251) haben diese Entdeckung weitgehend bestätigt, haben aber zudem gezeigt, daß in gutdifferenzierten HCC verschiedene Tumorzellen auch positiv für HBsAg sein können, jedoch nicht für HBcAg.

Das wurde weiter bestätigt durch Untersuchungen von zwei Zellreihen, abgeleitet von gutdifferenzierten menschlichen HCC (7, 132, 346). Diese Zellreihen produzieren HBsAg, aber keine anderen viralen Proteine (60, 353).

Auch TREVISAN et al (372) zeigen, daß HBsAg und HBcAg in gutdifferenzierten Lebercarcinomen gefunden werden können.

Bei unseren HBsAg-positiven Fällen handelt es sich jedoch ausschließlich um mäßigdifferenzierte HCC (Abb. 13). Wir fanden es bei 3 (4 %) der HCC-Fälle, die in zwei Fällen ein trabekuläres Muster und in einem Fall ein trabekulär-pseudoglanduläres Muster aufwiesen. Bei HBsAg-positiven Tumorzellen ist ein trabekuläres Muster das häufigste (135). In einigen Fällen wurde auch ein HCC vom polygonalen Zelltyp mit fibrösem Stroma (alte Nomenklatur: eosinophiles Carcinom mit lamellärer Fibrose) in Verbindung mit HBsAg-positiven Tumorzellen gefunden (132, 290). Dies ist uns jedoch nicht gelungen. Ebenso konnten wir in Cholangiocarcinomen kein HBsAg nachweisen. HBsAg wird nicht in Gallengängen, proliferierenden Gallengangszellen oder in Gefäßen gefunden (372).

Aus der Studie von AKAGI (8) geht hervor, daß keine Verbindung zwischen dem histologischen Grad von HCC und der Anwesenheit von HBsAg besteht.

TREVISAN et al (372) entdeckten HBsAg in 8 Fällen (7,5 %) von 107 HCC-Fällen in Tumorzellen. Die Zahl der HBsAg-positiven Zellen war im Tumorgewebe geringer als im normalen Lebergewebe. ILARDI et al (151) fanden HBsAg feingranulär in 3 (16 %) von 18 HCC-Fällen in den Tumorzellen. Die Anzahl und Vertei-

lung der HBsAg-positiven Zellen war unterschiedlich und schwer zu bestimmen. THUNG et al (375) entdeckten herdförmig eine mäßige Zahl feingranulärer HBsAg-positiver Tumorzellen bei 7 (77 %) von 9 HCC-Fällen bei Patienten mit HBsAg-positivem Serum. Sie fanden ein signifikant höheres Auftreten von HBsAg-positiven Tumorzellen in HCC als vorangegangene Untersuchungen (67, 169, 250, 251, 252, 375, 382).

HBsAg-positive Tumorzellen sind überwiegend herdförmig, seltener vereinzelt, und häufig an der Peripherie des Tumorgewebes, angeordnet. Das bedeutet, daß es Areale gibt, in denen keine HBsAg-positiven Tumorzellen zu finden sind.

Die Diskrepanz über die Häufigkeitsangabe beim Vorkommen von HBsAg-positiven Tumorzellen in HCC kann darin begründet sein, daß solche Areale bei der Sektion nicht vollständig mitentnommen wurden.

Auch in unseren Fällen war die herdförmige Anordnung mit HBsAg-negativen Arealen zu finden.

Das HBsAg ist diffus, peripher, perinukleär oder im gesamten Cytoplasma angeordnet; gelegentlich in nekrotischen Bezirken (372, 397).

4.2.2 HBsAg-Vorkommen bei Hepatocellulären Carcinomen und bei Kontrollgruppen

Untersuchungen verschiedener Gebiete mit HCC zeigten, daß das Vorkommen von HBsAg im Lebergewebe oder Serum bedeutend höher bei Patienten mit HCC war als bei der Normalbevölkerung (8, 131, 167, 224, 250, 290, 363, 367, 376).

4.2.3 Vorkommen von HBsAg in Kombination mit Zirrhose

HBsAg wurde häufiger in Verbindung mit Zirrhose als ohne gefunden (8, 290, 372, 380). Auch in unserer Studie sind 9 (90 %) von 10 HBsAg-positiven Fällen, im Tumor- und im nicht tumorösen Lebergewebe, mit Zirrhose kombiniert.

Die Verbreitung von HBsAg bei Patienten mit PLC und Zirrhose ist höher als bei Patienten mit PLC ohne Zirrhose, und die Verbreitung von HBsAg bei PLC-Patienten ohne Zirrhose ist größer als bei den Kontrollen (380). Auch unsere Ergebnisse entsprechen diesen Angaben.

4.2.4 %-Verteilung der HBsAg-positiven Zellen im Tumorgewebe von Hepatocellulären Carcinomen

Durch die herdförmige Anordnung der HBsAg-positiven Tumorzellen mit HBsAg-negativen Arealen, ist die Verteilung der Zellen schwer zu beurteilen.

Die Verteilung in den 3 positiven HCC-Fällen lag in zwei Fällen unter 10 %, in einem Fall zwischen 10 und 50 %. In allen Fällen war HBsAg auch im nicht tumorösen Lebergewebe zu finden.

4.2.5 Kombiniertes Auftreten HBsAg-positiver Tumorzellen mit anderen Antigenen

THUNG et al (375) berichten, daß 54 % von 37 HCC-Fällen zwei oder mehr Antigene enthalten. Kombiniert waren u. a. in vier Fällen HBsAg mit a_1AT und in 2 Fällen HBsAg mit AFP. In vier Fällen waren a_1AT , AFP und HBsAg oder CEA und in einem Fall alle vier Antigene enthalten.

In unserer Untersuchung ist ein Fall der drei HBsAg-positiven HCC-Fälle mit CEA kombiniert.

4.2.6 Nachweis HBsAg-positiver Zellen im nicht tumorösen Lebergewebe Hepatocellulärer Carcinome

TREVISAN et al (372) entdeckten HBsAg in 16 (15 %) von 107 HCC-Fällen im Cytoplasma von Hepatocyten und ILARDI et al (151) fand es feingranulär in 15 (83 %) von 18 HCC-Fällen in den Hepatocyten.

Wir fanden HBsAg in 10 Fällen (12 %) von 82 PLC-Fällen im nicht tumorösen Lebergewebe, und zwar ausschließlich nur in HCC (14 %). Die Verteilung der positiven Hepatocyten lag in vier Fällen unter 10 % und in sechs Fällen zwischen 10 und 50 %. In drei dieser Fälle tritt HBsAg auch im Tumor auf. Bei neun (90 %) dieser Fälle haben wir eine Zirrhose gefunden. HBsAg-positive Hepatocyten sind hauptsächlich im peritumoralen, zirrhotischen Gewebe angesiedelt (122, 151, 251). Wir fanden sie überwiegend herdförmig angeordnet, seltener diffus oder vereinzelt.

4.2.7 Korrelation des Serum-HBsAg mit dem Gewebe-HBsAg

Einige Autoren (122, 270) berichten von einer Korrelation des HBsAg-Serum-Nachweises mit dem Ausfall im Gewebe. Dies wird von CREMER (73) nicht bestätigt.

In einem unserer chirurgischen Fälle konnte HBsAg im Serum nachgewiesen werden. Jedoch war in diesem Fall der Tumor HBsAg-negativ, nur im nicht tumorösen Lebergewebe wurden positive Hepatocyten mit einer Verteilung zwischen 10 und 50 % gefunden. Bei diesem Fall war auch das Serum-AFP signifikant mit einem Wert von 48000 ng/ml erhöht.

4.2.8 Das Durchschnittsalter der HBsAg-positiven HCC-Fälle

Bei unseren positiven HCC-Fällen beträgt das Durchschnittsalter 54,7 Jahre. Dies steht im Einklang mit den Angaben in der Literatur, die ein Durchschnittsalter der HBsAg-positiven HCC-Fälle von 53,1 Jahre angeben (8, 100, 224, 398).

HBsAg-negative HCC-Fälle weisen dagegen ein höheres Durchschnittsalter und eine breitere Altersverteilung auf (8). Es beträgt bei unserer Untersuchung 64,5 Jahre.

VIII. Zusammenfassung

82 primäre Lebercarinome (PLC) wurden immunhistochemisch auf ihren Gehalt an carcinoembryonalem Antigen (CEA), alpha-Fetoprotein (AFP), alpha₁-Antitrypsin (a₁AT) und Hepatitis-B-surface-Antigen (HBsAg) in Tumorzellen und im nicht tumorösen Lebergewebe untersucht.

46 (56%) der Fälle waren Marker-positiv in den Tumorzellen bzw. in den nicht tumorösen Hepatozyten. In 18 (39%) der 46 Marker-positiven Tumoren traten die Marker in den Tumorzellen kombiniert auf.

14 (20%) der Hepatocellulären Carcinom-(HCC-)Fälle (n=70) enthalten zwei oder mehr Marker. Eine charakteristische Kombination für einen bestimmten Tumor ergab das Auftreten der vier Proteine nicht.

In 63 Fällen (77%) der 82 PLC war eine Zirrhose vorhanden.

CEA-positive Tumorzellen wurden in 14 (17%) der PLC bzw. in 10 (14%) der HCC gefunden.

AFP wurde in Tumorzellen von 14 (17%) der PLC- bzw. in 13 (19%) der HCC-Fälle nachgewiesen. AFP konnten wir in keinem reinen Cholangiocarcinom finden. Allerdings war in einem kombinierten PLC AFP in Tumorzellen des Cholangiocarcinom-Anteils darzustellen. In keinem Fall war AFP im nicht tumorösen Lebergewebe zu finden. AFP ist nach a₁AT das zweithäufigste Antigen in den Tumorzellen von HCC.

In einem von acht chirurgischen Fällen, bei denen AFP im Serum bestimmt wurde, korreliert der signifikant hohe AFP-Serumwert von 48.000 ng/ml mit dem AFP im Tumorgewebe bei einer Verteilung der AFP-positiven Zellen von über 50%. In diesem Fall konnte auch der HBsAg-Nachweis im Serum und immunhistochemisch im nicht tumorösen Lebergewebe erbracht werden, jedoch bei HBsAg-negativem Befund im Tumorgewebe.

28 (34%) der PLC bzw. 24 (34%) der HCC sind im Tumorgewebe a₁AT-positiv. Es ist uns gelungen a₁AT auch im Tumorgewebe von

Cholangiocarcinomen nachzuweisen. Das α_1 AT ist das am häufigsten auftretende Antigen in Tumorzellen von HCC, sowie der am häufigsten in Kombination mit anderen Antigenen, überwiegend mit AFP, auftretende Marker in diesen Zellen. In keinem unserer Fälle ist uns bekannt, ob bei den Patienten ein α_1 AT-Mangel nachgewiesen wurde. Nur in 3 (4%) der 70 HCC fanden wir globale α_1 AT-Reaktionen im nicht tumorösen Lebergewebe. In einigen Fällen zeigte sich eine diffuse Reaktion im Cytoplasma der Leberzellen, die zum Teil in periportalen Hepatocyten auftrat, die wir jedoch nicht als Hinweis auf einen α_1 AT-Mangel berücksichtigten.

HBsAg-positive Tumorzellen bei PLC fanden wir in 3 (4%) ausschließlich nur mäßigdifferenzierten HCC mit überwiegend trabekulärem Muster, sowie im nicht tumorösen Lebergewebe von 10 (14%) der 70 HCC-Fälle.

9 (90%) der 10 HBsAg-positiven HCC-Fälle sind mit Zirrhose verbunden.

Im Tumor- und im nicht tumorösen Lebergewebe von Cholangiocarcinomen konnten wir HBsAg nicht nachweisen.

Durch die herdförmige Anordnung HBsAg-positiver Zellen mit HBsAg-negativen Arealen, ist der %-Satz HBsAg-enthaltender Zellen schwer zu schätzen.

In einem von fünf chirurgischen Fällen, bei denen HBsAg im Serum bestimmt wurde, war HBsAg nur im Serum und nicht im Tumorgewebe, im nicht tumorösen Lebergewebe jedoch nachweisbar. Dieser Fall ist identisch mit dem Fall, bei welchem der signifikant hohe AFP-Serumwert von 48.000 ng/ml gefunden wurde.

Für das Wiederauftreten der fetalen Proteine bei der Entdifferenzierung von Hepatocyten ist, unter Berücksichtigung der Literatur, die Synthesehemmung eines als Repressor agierendes Protein oder die Aktivierung von normalerweise stummen fetalen Zellklonen anzunehmen, sowie die Hypothese aufzustellen, daß die verschiedene Marker-produzierenden Tumoren die entsprechende genetische Information besitzen. Diese Hypothese ist vor

allem für das HBsAg zutreffend.

Die Persistenz von a₁AT in Tumorzellen primärer Lebercarcinome läßt auf eine pathologische Speicherung und/oder gesteigerte Synthese bei Ausschleussungsdefekt schließen, charakterisiert durch die Veränderung eines strukturellen Genes.

Das kombinierte Auftreten von zwei oder mehr Antigenen bzw. Proteinen in HCC-Zellen ist als Hinweis auf die funktionelle Heterogenität dieser Zellen zu werten, auch wenn sie histologisch monomorph erscheinen.

IX. Verwendete Symbole

AFP	_____	alpha-Fetoprotein
a ₁ AT	_____	alpha ₁ -Antitrypsin
ATM	_____	alpha ₁ -Antitrypsin-Mangel
CC	_____	Cholangiocarcinom
CEA	_____	carcinoembryonales Antigen
HBsAg	_____	Hepatitis-B-surface-Antigen
HBV	_____	Hepatitis-B-Virus
HCC	_____	Hepatocelluläres Carcinom
Komb. PLC	_____	kombiniertes primäres Lebercarcinom
PLC	_____	primäres Lebercarcinom
PCFS	_____	HCC vom polygonalen Zelltyp mit fibrösen Stroma

X. Literatur

1. Aagaenæs, Ø, A. Matlary, K. Elgio et al.: Neonatal cholestasis in alpha-1-antitrypsin deficient children. Acta Paediatr. Scand. 61, 632, 1972
2. Abelev: Production of embryonal a-globulin by transplantable mouse hepatoma; Transplantat 1, 174, 1963
3. Abelev, G.I., I.V. Assecritova, N.A. Kraevsky, S.D. Petrova, N.I. Perevodchikova: Embryonal serum alpha-globulin in cancer patients: diagnostic value. Int. J. Cancer 2, 551, 1967
4. Abelev, G.I.: Production of embryonal serum alpha-globulin by hepatomas: review of experimental and clinical data. Cancer Res. 28, 1344, 1968
5. Abelev, G.I.: Alpha-foetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. Advanc. Cancer Res. 14, 295, 1971
6. Abeyounis, C.J., F. Milgrom: Studies on carcinoembryonic antigen. Int. Arch. Allergy 43, 30 1972
7. Aden, D.P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov, B.B. Knowles: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinomaderived cell line. Nature 282:615-616, 1979
8. Akagi, G.O., K. Furuya, H. Otsuka: Hepatitis B antigen in the liver in hepatocellular carcinoma in Shikoku, Japan. Cancer 49:678, 1982
9. Akeyama, T., T. Kamada, T. Koizumi, H. Abe: The localization of the australia antigen in the liver by immunofluorescence. J. Path. 25, 1071, 1972
10. Akeyama, T., T. Koyama, T. Yamada: Alpha-fetoprotein in acute viral hepatitis. New Engl. J. Med. 287, 989, 1972
11. Akeyama, T. T. Kamada, M. Koyama, H. Abe: Distribution patterns of hepatitis B antigen in the liver. Arch. Path. 98, 252-256, 1974
12. Alexander, P.: Foetal antigens in cancer. Nature (Lond.) 235, 137, 1972
13. Alexander, J.J., E.M. Bey, E.W. Geddes, G. Lecatsas: Establishment of a continuously growing cell-line from primary carcinoma of the liver. S. Afr. J. med. Sci. 50:2124-2128, 1976
14. Almeida, J.D., A.J. Zuckerman, P.E. Taylor: Immune election microscopy of the Australia-SH (serum hepatitis) antigen. Microbios. 1, 117, 1969
15. Alpert, M.E., J. Uriel, B. de Nechaud: Alpha 1-foetoglobulin in the diagnosis of hepatoma. New Engl. J. Med. 278, 984, 1968

16. Alpert, Hutt, Davidson: Primary hepatoma in Uganda. Amer. J. Med. 46, 794, 1969
17. Alpert, E., T.E. Starzl, P.H. Schur, K.J. Isselbacher: Serum alpha-fetoprotein in hepatoma patients after liver transplantation. Gastroenterology 61, 144, 1971
18. Alpert, M.E., M.S.R. Hutt, G.N. Wogan, C.S. Davidson: Association between aflatoxin content and hepatoma frequency in Uganda. Cancer 28:253-260, 1971
19. Alpert, M.E., R. Hershberg, P.H. Schur, K.J. Isselbacher: Alpha-fetoprotein in human hepatoma: improved detection in serum and quantitative studies using a new sensitive technique. Gastroenterology 61, 137, 1971
20. Alpert: Human AFP. In: K. Okuda, R.L. Peters (Hrsg.): Hepatocellular carcinoma. John Wiley & Sohn, New York-London-Sydney-Toronto, S. 353, 1976
21. Andre, F., C. Andre, R. Lambert, F. Descos: Prevalence of α_1 -antitrypsin deficiency in patients with gastric or duodenal ulcer. Biomedicine 21, 222, 1974
22. Anthony, P.P., C.L. Vogel, F. Sakikali, L.F. Barker, M.R. Peterson: Hepatitis-associated antigen and antibody in Uganda: correlation of serological testing with histopathology. Br. Med. J. 1:403-406, 1972
23. Auer, I.O., K.H. Kress: Suppression of the primary cell-mediated immune response by human alpha-1-fetoprotein in vitro. Cellular Immunology 30, 173-179, 1977
24. Auer, I.O., L. Schmid, E. Ziemer, H. Sommer, U. Epping: Die klinische Wertigkeit der Plasma-CEA-Konzentration zur Aktivitätskontrolle chronisch entzündlicher Darm-erkrankungen. Z. Gastroenterol., Verhandlungsband 11, 109, 1976
25. Babb, R.R., G.A. Lillington, R.L. Kempson: Cirrhosis in an adult with emphysema and alpha₁-antitrypsin deficiency. Amer. J. digest. Dis. 18:803-807, 1973
26. Balasegaram: Management of primary liver cell carcinoma. Amer. J. Surg. 130, 33, 1975
27. Belanger L.: Tyrosinémie héréditaire et alpha-foetoprotéine. II. Recherche tissulaire comparée de l'alpha-foetoprotéine dans deux cas de tyrosinémie héréditaire. Considérations sur l'ontogénèse de la foetoprotéine humaine. Path.et Biol. 21,457, 1973
28. Berg, Eriksson: Liver disease in adults with alpha-1-antitrypsin deficiency. N. Eng. J. Med. 287, 1264, 1972
29. Bergstrand, C.G., B. Czar: Demonstration of a new protein fraction in serum from human fetus. Scand. J. clin. Lab. Invest. 8, 174, 1956
30. Berman: Primary carcinoma of the liver. London: H.K. Lewis & Co. 1951

- 30a. Berman M., Libey P., Foster J.: Hepatocellular Carcinoma. Cancer 46:1448-1455, 1980
31. Bianchi, L., F. Gudan: Core- und Hüllenantigen des Dane-Partikels im Lebergewebe. Beziehung zu den Verlaufsformen der Hepatitis B. Leber-Magen-Darm 5:175, 1975
32. Blair, O.M., D.M. Goldenberg: A correlative study of bronchial cytology, bronchial washing carcinoembryonic antigen, and plasma carcinoembryonic antigen in the diagnosis of bronchogenic cancer. Acta cytologica, Vol. 18, No. 6, 510-514, 1974
33. Blenkinsopp, W.K.: α_1 -antitrypsin bodies, Pi. Z. phenotype, and peptic ulcer. Gut. 19, 157, 1978
34. Blenkinsopp, W.K., G.P. Haffenden: Aetiology of cirrhosis, hepatic fibrosis, and hepatocellular carcinoma. Journal of Clinical Pathology, 30, 579-584, 1977
35. Bloomer, J.R., T.A. Waldmann, K.R. McIntire, G. Klatskin: Serum alpha-fetoprotein levels in patients with nonneoplastic liver disease (24th Ann. Meeting Ann. Assoc. Study Liver Dis. Chicago, USA, 1973). Gastroenterology 65, 1973
36. Blum, H., W. Gerok: Reinigung und Charakterisierung des Hepatitis-B-Surface-Antigens (HBsAg). Verh. d. Dtsch. Ges. f. Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Basel 1981
37. Blumberg B.S., Alter H.J., Visnich S.: A "new" antigen in leukemia sera. Amer. Med. Ass. 191:541, 1965
38. Blumberg B.S., Melartin L., Guinto R.A., Werner B.: Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen). Amer. J. human. Genet. 18:594, 1966
39. Blumberg B.S., Gerstley B.J., Hungerford D.A., London W.T., Sutnick A.I.: A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. Ann. int. Med. 66:924, 1967
40. Blumberg B.S., Sutnick A.I., London W.T., Millman I.: Hepatitis in hemodialysis units. New Engl. J. Med. 283, 1970
41. Blumberg, B.S. B. Larouzé, W.T. London et al.: The relation of infection with hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. Am. J. Pathol. 81:669-682, 1975
42. Bodin, E., J. Scotto, J.C. Homberg, H. Lichtenstein, M. Roudier, C. Huguet: Association hépatomeantigène Australia: un cas étudié en microscopie électronique et en immunofluorescence. Nouv. Presse méd. 3, 2487-2489, 1974
43. Boogs, P.B., A.L. Stephens jr., D.E. Jenkins: Emphysema Associated with a Deficiency in Alpha-1-Antitrypsin Globulin. South. med. J. 64, 426-430, 1971
44. Booth, S.N., J.P.E. King, J.C. Leonard, P.W. Dykes: Serum carcinoembryonic antigen in clinical disorders. Gut 14, 794, 1973

45. Bordes, M., R. Michiels, F. Martin: Detection by immunofluorescence of CEA in colonic carcinoma, other malignant or benign tumours and non cancerous tissues. Digest 9, 106, 1973
46. Brackertz, D.: Proteinaseinhibitoren bei rheumatischen Erkrankungen. Dtsch. Med. Wschr. 103, 1844, 1978
47. Bradfield, J.W.B., W.K. Blenkinsopp: Alpha-1-antitrypsin globules in the liver and PiM phenotype. J. Clin. Pathol. 30, 464, 1977
48. Brock, D.J.H., R.G. Sutcliffe: Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. Lancet II, 197, 1972
49. Brock, D.J.H., A.E. Bolton, J.M. Monaghan: Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum-alpha-fetoprotein measurement. Lancet II, 923, 1973
50. Brock, D.J.H., A.E. Bolton, J.B. Scrimgeour: Prenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly through maternal plasma-alpha-fetoprotein measurement. Lancet I, 767, 1974
51. Buffe, D.: Fetoproteins and children's tumors. Gann. 14, 117, 1973
52. Burtin, P., M.C. Sabine, G. Chavanel: Presence of carcinoembryonic antigen in children's colonic mucosa. Int. J. Cancer 10, 72, 1972
53. Burtin, P., L. Martin, M.C. Sabine, S. von Kleist: Immunological study of polyps of the colon. J. nat. Cancer Inst. 48, 25, 1972
54. Burtin, P.: Les antigens carcinoembryonnaires. Schweiz. med. Wschr. 102:1154, 1972
55. Burtin, P., D. Buffe, S. von Kleist: Die karzinoembryonalen Antigene der menschlichen Tumoren. Triangel (De) 11, 123, 1973
56. Burtin, P., S. von Kleist, M.C. Sabine, M. King: Immunohistological localisation of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting antigen in gastrointestinal normal and tumoral tissues. Cancer Res. 33, 3299-3305, 1973
57. Burtin, P.: Membrane antigens of the colonic tumors. Cancer 34:829-834, 1974
58. Burtin, P.: Tumor-associated products, Nature and significance of the antigens associated with human gastrointestinal tumors. J. clin. Path., 27, Suppl. 7, 11-118, 1974
59. Busch: Leberzirrhose und primäres Leberkarzinom. Österr. Z. Onkol. 1974

60. Chakraborty, P.R., N. Ruiz-Opazo, D. Shouval, D.A. Shafritz (to be published): Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in a human hepatocellular carcinoma cell line which produces hepatitis B surface antigen. *Nature*.
61. Chayvialle, J.A., P.C. Ganguli: Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in human plasma. *Lancet* 7816, 1355, 1973
62. Chen, D.S., J.L. Sung: Hepatitis B surface antigen and a-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 74:163, 1978
63. Chu, M.L., W.S.J. Lin, T.O. Yoshida, S.H. Chu, T.Y. Lin: Demonstration of AFP in hepatoma tissue by fluorescent antibody technique. *Cancer* 34:268-273, 1974.
64. Chu, T.M., S.K. Shukla, A.O. Mittleman, G.P. Murphy: Plasma carcinoembryonic antigen in renal cell carcinoma patients. *J. Urol.* 111, 742-744, 1974
65. Chudwin D., Rucknagel D., Scholnik A., Waldmann T., McIntire K.: Fetal Hemoglobin and a-Fetoprotein in Various Malignancies. *Acta haemat.* 58:288, 1977
66. Cleve, H.: Quantitative immunologische Bestimmung von saurem Alpha-1-Glycoprotein und Alpha-1-Antitrypsin; Serumkonzentrationen bei gesunden Blutspendern. *Klin. Wschr.* 44, 1256-1260, 1966
67. Cohen, C., S.D. Berson, E.N. Geddes: Hepatitis B antigen in black patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 41:245, 1978
68. Cook, P.J.L.: Genetic aspects of the Pi system. *Post-graduale Medical Journal* 50:362-364, 1974
69. Coordinating Group for the Research of Liver Cancer: *Am. J. Chinese Med.* 2:241, 1974
70. Cossart, Y.E.: Australia Antigen and Hepatitis. *J. clin. Path.* 24:394, 1971
71. Cossart, Y.E.: Epidemiology of serum hepatitis. *Brit. med. Bull.* 28:156, 1972
72. Coyne, V., V.E.I. Millmann, J. Cerda, B.J.S. Gerstley, T. London, A. Sutnick, B.S. Blumberg: The localisation of Australia antigen by immunofluorescence. *J. exp. Med.* 131, 307, 1970
- 72a. Craig J., Peters R., Edmondson H., Omata M.: Fibrolamellar Carcinoma of the Liver. *Cancer* 46:372, 1980
73. Cremer, H.: Histologische und zytologische Kriterien zur Klassifikation der primären Leberzellkarzinome. *Leber, Magen, Darm* 10, Nr. 2:74, 1980

74. Dati F., Grenner G., Schmidtberger R.: Quantitation of a-Foetoprotein by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *J. Clin.Chem. Clin.Biochem.* 19:216, 1981
75. Deinhardt, F., G.G. Frösner: Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Virushepatitis. *Internist* 8:188, 1977
76. DeLellis, R.A., K. Balogh, F.B. Merk, A.M. Chirife: Distinctive hepatic cells globules in adult alpha-1-antitrypsin deficiency. A histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Arch. Path.* 94: 308-136, 1972
77. Dilawari, J.B., J.M. Lennart-Jones, A.M. Mackay, J.K. Ritchie, H.G. Sturzacker: Estimation of carcino-embryonic antigen in ulcerative colitis with special reference to malignant change. *Gut* 16, 255, 1975
78. Edgington, T.S., D.J. Ritt: Intrahepatic expression of serum hepatitis virus associated antigens. *J. Exp. Med.* 134, 871, 1971
79. Eggel: Über das primäre Karzinom der Leber. *Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path.* 30, 506, 1901
80. Endo, J., K. Kanai, S. Iino, T. Oda: Clinical significance of alpha-fetoprotein with special reference to primary cancer of the liver. *Gann.* 14, 67, 1973
81. Endo Y., Kanai K., Oda T., Mitamura K., Iino S., Suzuki H.: Clinical significance of a-fetoprotein in hepatitis and liver cirrhosis. *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 259,234, 1975
- 81a. Endo Y., Fujino M., Kodama T., Oda T., Burtin P.: Carcino-embryonic antigen in benign liver diseases. *Carcino-Embryonic-Proteins, Vol.I, Ed., F.-G.Lehmann, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press* 1979
82. Engelhardt, N.V., L.Ya. Shipova, A.I. Goussev, A.K. Yazova, E.N. Ter-Grigorova: Observation on the alpha F-globulin in secretions on human embryo liver and the liver of newborn mice by the fluorescent antibody method. *Bull. exp. Biol. Med. (USSR)* 68:62, 1969
83. Engelhardt, N.V., A.I. Goussev, L. Shipova, G.I. Abelev: Immunfluorescent study of alpha-fetoprotein (alpha fp) in liver and liver tumors. I Technique of alpha fp localization in tissue sections. *Int. J. Cancer* 7, 198, 1971
84. Engelhardt, N.V., V.S. Poltoranika, A.K. Yazova: Localization of alpha-fetoprotein in transplantable murine teratocarcinomas. *Int. J. Cancer* 11:448, 1973
85. Eriksson, S.: Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.* 175, 197, 1964
86. Eriksson, S.: Studies in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.* 432, 1, 1965
87. Eriksson, S., I. Hagerstrand: Cirrhosis and malignant hepatoma in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.* 195:451-458, 1974

88. Eriksson, S., C. Larsson: Purification and partial characterization of PAS-positive inclusion bodies from the liver in alpha-1-antitrypsin deficiency. *New Engl. J. Med.* 292, 176, 1975
89. Eriksson, S., T. Moestrup, I. Hägerstrand: Liver, lung and malignant disease in heterozygous (PiMZ) alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.* 198, 243, 1975
90. Eriksson, S.: Proteases and protease inhibitors in chronic obstructive lung disease. *Acta Med. Scand.* 203, 449, 1978
91. Fagerhol, M.K., C.B. Laurell: The Polymorphism of Prealbumins and Alpha-1-Antitrypsin in Human Sera. *Clin. chim. Acta* 16, 199-203, 1967
92. Fagerhol, M.K.: The Pi-system: genetic variants of serum alpha-1-antitrypsin. *Ser. Haematol.* 1:153-161, 1968
93. Fagerhol, M.K., T. Gedde-Dahl jr.: Genetics of the Pi-Serum Types. *Hum. Hered.* 19, 354-359, 1969
94. Fagerhol, M.K., C.B. Laurell: The Pi-System. inherited Variants of Serum Alpha-1-Antitrypsin. *Prog. Med. Genet.* 7, 96-111, 1970
95. Fagerhol, M.K.: Genetics of the Pi-system; in: Mittman Pulmonary emphysema and proteolysis, pp. 123-131 (Academic Press, New York 1972)
96. Feldmann, G., J. Bignon, P. Chahinian: Antitrypsin deficiency. *Lancet* I, 1515, 1973
97. Feldmann et al.: The liver in α_1 -Antitrypsin deficiency. *Digestion* 10:162, 1974
98. Finch, S.C., C.A. Finch: Idiopathic hemochromatosis. *Medicine* 34:381-430, 1955
99. Fisher, R.L., L. Taylor, S. Sherlock: Alpha-1-antitrypsin deficiency in liver disease: The extent of the problem. *Gastroenterology* 71, 646, 1976
100. Fisher, R.L., P.J. Scheuer, S. Sherlock: Primary liver cell carcinoma in the presence or absence of hepatitis B antigen. *Cancer* 38:901-905, 1976
101. Florin-Christensen, A., R.M. Arana: Alpha-1-fetoprotein and anti-alpha-fetoprotein in acute viral hepatitis. *Brit. med. J.* II, 94, 1973
102. Galdo, A., J.P. Casado, R. Talavera: Démonstration dans le sérum du fœtus humain d'une nouvelle fraction protéique au moyen de l'électrophorèse sur papier. *Arch. Franc. Pédiat.* 16:954, 1959
103. Gangl, Mlczoch, Korn, Feigl, Grabner: Auftreten zahlreicher pulmonaler Rundherde bei Leberzirrhose. Ein diagnostisches Problem? *Leber-Magen-Darm* 6, 361, 1976

104. Ganrot, P.O., C.B. Laurell, S. Eriksson: Obstructive lung disease and trypsin inhibitors in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 19, 205, 1969
105. Ganz, Joller-Jemelka, Grob: Stark vermehrtes AFP und assoziierte Erkrankungen. *Schweiz. med. Wschr.* 109, 1314, 1979
106. Gassner, M., P.J. Grob: Alpha-1-Fetoprotein, Hepatom und Teratom. *Schweiz. med. Wschr.* 102:465, 1972
107. Geddes, D.M., D.A. Brewerton, M. Webley, C.W. Turton, M. Turner-Warwick, A.H. Murphy, A.M. Ward: Alpha₁-antitrypsin phenotypes in fibrosing alveolitis and rheumatoid arthritis. *Lancet* 2:1049-1051, 1977
108. Gerber, Thung: Carcinoembryonic antigen in normal and diseased liver tissue; *Am. J. Pathol.* 92, 671-9, 1978.
109. Gerok, W.: Virushepatitis: Moderne Aspekte serologischer Diagnostik und Prophylaxe. *Med. Welt Bd.* 33, 3:19/77, 1982
110. Gherardi, G.J.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and its effect on the liver. *Hum. Pathol.* 2, 173, 1971
111. Gitlin, D., M.D. Boesman: Serum-alpha-fetoprotein, albumin and gamma-G-globulin in the human conceptus. *J. clin. Invest.* 45, 1826, 1966
112. Gitlin, D., A. Perricelli, G. Gitlin: Synthesis of alpha-fetoprotein by liver, yolk sac and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res.* 32, 979, 1972
113. Glasgow, J.F.T., M.J. Lyncii, A. Hercz, H. Levison, A. Sass-Kortsak: Alpha, antitripsyin deficiency in association with both cirrhosis and chronic obstructive lung disease in two sibs. *Amer. J. Med.* 54:181-194, 1973
114. Gold, Ph., S.O. Freedman: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122, 467-481, 1965
115. Gold, P., S.O. Freedman: Demonstration of tumor-spezifische antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption technique. *J. Exp. Med.* 121:439, 1965
116. Gold, P.: Circulating antibodies against CEA of the human digestive system. *Cancer* 2:1663, 1967
117. Gold, P., A. Gold, S.O. Freedman: Cellular location of carcinoembryonic antigens of the human digestivesystem. *Cancer Res.* 28, 1331, 1968
118. Gold, P., D.M.P. Thomson, S.O. Freedman: Circulating carcinoembryonic antigens. (Abst.) *Clin. Res.* 17, 476, 1969

119. Gold, P., J. Krupey, H. Ansari: Position of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system in ultrastructure of tumor cell surface. *J. Natl. cancer Inst.* 45:219-222, 1970
120. Goldberg, D.M., N.G.O. Tschilinguirian, H.J. Hansen, J.P. Vandervorde: Carcinoembryonic antigen present in mekonium, the basis of a possible new diagnostic test of fetal distress. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 113, 66, 1972
121. Gordon, H.W., J. Dixon, J.C. Rogers, C. Millmann, J. Lieberman: Alpha-1-antitrypsin accumulation in livers of emphysematous patients with α -1-AT deficiency. *Hum. Pathol.* 3, 361, 1972
122. Goudeau, A. P. Maupas, P. Coursaget et al.: Hepatitis B virus antigens in human primary hepatocellular carcinoma tissues. *Int. J. Cancer.* 24:421, 1979
123. Goussev, A.I., N.V. Engelhardt, R. Masseyeff, R. Camain, B. Basteris: Immunofluorescent study of alpha-fetoprotein (alpha fp) in liver and liver tumours. II. Localization of alpha fp in the tissues of patients with primary liver cancer (PLC). *Int. J. Cancer* 7, 207, 1971
124. Grabar P.,: Introductory remarks on foetal proteins and their reappearance in tumors. *Prot.Biol.Fluids* 18:201,1971
125. Graham, R.C., M.J. Karnovsky: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14:291-298, 1966
126. Grob L., Joller-Jemelka H.: α -Fetoprotein in der Onkologie. *Laboratoriumsblätter* 2/1982
127. Gubert, J.-P., J.-P. Gallet, J.-M. Babinet, I. Saint Jacques: Cirrhose infantile et déficit en alpha antitrypsine. A propos d'une observation. *Ann. Pédiat. Paris* 21, 463-467, 1973
128. Hadziyannis S. (to be published): The "ground-glass" hepatocyte: An aid to diagnosis - a challenge to pathophysiology. In: Berk PD (ed) *Frontiers in liver disease*. Thieme-Stratton, New York.
129. Hadziyannis, S. G.E. Merikas, A.P. Afroudakis: Hepatitis-associated antigen in chronic liver disease. *Lancet* II:100, 1970
130. Hadziyannis, S., M.A. Gerber, C. Vissoulis, H. Popper: Cytoplasmic hepatitis B antigen in "ground-glass" hepatocytes of carriers. *Arch. Pathol.* 96:327, 1973
131. Hadziyannis, S., G. Karvoutzis, E. Manassis, A. Giustozzi, G. Merikas: Diagnostic significance of serial α_1 -fetoprotein determination by radioimmunoassay in cirrhosis. *Digestion* 12, 267-268, 1975

132. Hadziyannis, S., A. Giustozi, A. Moussouros, G. Merikas: Hepatitis B core and surface antigens in the liver in primary liver cell carcinoma. In: Diseases of the Liver and Biliary Tract (Ed.) Leevy, C.M. pp. 174-178, 1976. Basel: S. Karger.
133. Hadziyannis, S. D. Trichopoulos: Hepatocellular carcinoma in Greece and its relationship to the hepatitis B virus. In: Remmer, H. Bolt, H.M., Bannasch, P., Popper, H. (eds.) Primary liver tumors. MTP Press, Lancaster, p 431, 1978
134. Hadziyannis, S.: Hepatocellular carcinoma and type B hepatitis. Clin. Gastroenterol. 9:117, 1980
135. Hadziyannis, S.J.: Primary liver cancer and its relationship to chronic infection with the hepatitis B virus. Springer Semin. Immunopathol. 3 (4):473-85, 1981
136. Hahn, E.G., V. Gauss-Müller, M. Hornberger, H. Kalbfleisch, F. Deinhardt: Solide Tumoren menschlicher primärer hepatozellulären Karzinomzelllinien in hypothy-mischen Mäusen: ein Modell für biochemische und therapeutische Studien. Gastroenterologie 3:168-173, 1982
137. Hansen, H.J., K.P. Lance, J. Krupey: Demonstration of an ion sensitive antigenic site on carcino-embryonic antigen using zirconyl phosphate gel (Abstr.). Clin. Res. 19, 143, 1971
138. Hansen, H.J., J.J. Snyder, E. Miller, J.P. Vandevoorde, O.N. Miller, L.R. Hines, J.J. Burns: Carcinoembryonic antigen (CEA) assay - a laboratory adjunct in the diagnosis and management of cancer. Hum. Pathol. 5, 139-147, 1974
139. Hart, M.N.: Hyaline globules. Arch. Pathol. 96:144, 1973
140. Hasegawa, H., T. Mukojima, N. Hattori, R. Sano, T. Hirota: Embryonal carcinoma and alpha-fetoprotein with special reference of hepatoblastoma. Gann. 14, 129, 1973
141. Heidl, G., H. Grossman, M. Müller: Das karzinoembryonale Antigen (CEA), ein bedeutsames tumorassoziiertes Antigen des Menschen. Dtsch. Ges. wes. 28:335, 1972
142. Heimbürger, N., H. Haupt, H.G. Schwick: Proteinase inhibitors of human plasma. In: H. Fritz, H. Tschesche (Hrsg.): Proceedings of the International Research Conference on proteinase inhibitors. Walter de Gruyter, Berlin-New York, S. 1, 1971
143. Heimbürger, N., K. Heide, H. Haupt, H.E. Schultze: Bau-steinanalysen von Humanserumproteinen. Clin. chim. Acta 10:293-307, 1964

144. Hersh, T. F.B. Hollinger, R.K. Goyal, M.N. Grubb, J.L. Melnick: Australia antigen and antibody an alpha-fetoglobulin in hepatoma patients. *Int. J. Cancer* 8:259, 1971
145. Higginson: The geographical pathology of primary liver cancer. *Cancer Res.* 23, 1624, 1963
146. Hine K., Booth S., Dykes P., Leonard J.: Carcinoembryonic antigen concentrations in undiagnosed patients. *Lancet* 30:1337, 1978
147. Hirai, H., S. Nishi, H. Watabe: Some chemical, experimental, and clinical investigations of alpha-fetoprotein. *Gann.* 14, 19, 1973
148. Hirai, H., S. Nishi, H. Watabe: Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein. *J. nucl. Med.* 13, 783, 1973
149. Hirszfeld, L. W. Halber, J. Rosenblat: Untersuchungen über Verwandtschaftsreaktionen zwischen Embryonal- und Krebsgewebe. *Immunitätsforschung* 75, 209-216, 1932
150. Hubert, J., M.D. Wolfe, E. Philip, M.D. Palmer: Alpha-1-antitrypsin: Its immunohistochemical localization and significance in diagnostic pathology. Basic & clinical immunology, Lange Medical Publications 1978
151. Ilardi, C.F., Y.Y. Ying, L.V. Ackerman, J.M. Elias: Hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma in the People's Republic of China. *Cancer* 46:1612, 1980
152. Ishak, K.G., E.H. Jenis, M.L. Marshall, B.H. Bolton, G.C. Battstone: Cirrhosis of the liver associated with α_1 -antitrypsin deficiency. *Arch. Path.* 94:445-455, 1972
153. Ishii M.: Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein. *Gann Monogr. on Cancer Res.* 14, 89, 1973
154. Ishiguro, T., T. Nishimura: Radioimmunoassay of maternal serum alpha-fetoprotein associated with pregnancy. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 116, 27, 1973
155. Iwamura: Klinik des Leberkarzinoms. *Therapiewoche*, 26, 6122, 1976
156. Jautzke, M.D., M.D. Altenaehr: Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA) and its correlation with grading and staging on tissue sections of urinary bladder carcinoms. *Cancer* 50:2052-2056, 1982
157. Jeppson, J.O.: Aminoacid substitution Glu Lys in alpha-1-antitrypsin P1 *Z. FEBS Lett.* 65, 195, 1976
158. Jeppson, J.O., C. Larrson, S. Eriksson: Characterization of alpha-1-antitrypsin in the inclusion bodies from the liver in alpha-1-antitrypsin deficiency. *N. Engl. J. Med.* 18, 576, 1975

159. Johnson, Krasner, Portman et al.: Hepatocellular carcinoma in Great Britain: Influence of age, sex, HBs-Ag. Status and aetiology of underlying cirrhosis. Gut 19, 1022, 1978
160. Johnson P., Melia W., Palmer M., Portmann B., Williams R.: Relationship between serum alpha-fetoprotein, cirrhosis and survival in hepatocellular carcinoma. Br. J. Cancer 44, 502, 1981
161. Kaboth, U., A. Schober, H.J. Arndt, I. Vido, H. Sel-mair, E. Gallasch, P. Verma, R. Thomssen, W. Creutz-feldt: Australia (SH-) Antigen Befunde bei Leberkran-ken und Blutspendern. Dtsch. med. Wschr. 95:2157, 1970.
162. Kacaki J., Wolters G., Kuijpers L., Stulemeyer S.: Results of a multicentre clinical trial of the solid-phase enzyme immunoassay for hepatitis B surface antigen. Vox Sang. 35:65, 1978
163. Karitzky, D., M. Otto, J.-P. Martin: Ikterus prolonga-tus durch heterozygoten Alpha₁-Antitrypsinmangel? Klin. Wschr. 55, 1175, 1977
164. Keim et al.: a₁-Antitrypsinmangel mit Leberzirrhose und Lungenemphysem beim Erwachsenen; Leber, Magen, Darm 9, Nr. 5, 272, 1979
165. Kelly et al.: Alpha₁-Antitrypsin deficiency and hepa-tocellular carcinoma; J. Clin. Pathol. 32, 373, 1979
166. Kelsch, Kiener: Contribution a l'histoire de l'adenome du foie. Arch. Physiol. norm. et Path. 3, 622, 1876
167. Kew M.C., E.W. Geddes, G.M. MacNab, I. Bersohn: Hepati-tis B antigen and cirrhosis in Bantu patients with primary liver cancer. Cancer 34:539, 1974
168. Kew MC, Marcus R, Geddes EW: Some characteristics of Mozambican Shangaans with primary hepatocellular cancer. S.Afr.med. 51:306, 1977
169. Kew, M.C.: Hepatoma and the HBV. In Viral Hepatitis, edited by Vyas G.N., Cohen, S.N., Schmid, R., p 439. Philadelphia, The Franklin Institute Press, 1978
170. Khoo, S.K., I.R. Mackay: Carcinoembryonic antigen in serum in disease of the liver and pankreas. J. clin. Path. 26, 470 1973
171. Khoo, S.K., N.L. Warner, J. Lie, J.R. Mackay: Carcino-embryonic antigen activity of tissue extracts. A quan-titative study of malignant and benigne neoplasma, cirr-hotic liver, normal adult and fetal organs. Int. J. Canc. 11, 681, 1973
172. Kleinsmith L. Pierce G.: Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. Cancer Res.24:1544, 1964

173. Kleist von, S., P. Burtin: Localisation cellulaire d'un antigene embryonnaire de tumeurs colique humaines. *Int. J. Cancer* 4:874, 1969
174. Kleist von, S., P. Burtin: Isolation of a fetal antigen from human colonic tumor. *Cancer Res.* 29, 1961, 1969
175. Kleist von, S.: CEA, Immunochemical and immunohistological study. *Bull. Ass. franc. Cancer* 60, 393, 1973
176. Kleist von, S., M. King, P. Burtin: Characterization of a normal tissular antigen extracted from human colonic tumors. *Immunochemistry* 11, 249-253, 1974
- 176a. Kodama T., Fujino M., Endo Y., Fukazawa M., Sugiura M., Oda T., Wada T., Burtin P.: Carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-like substance in hepatobiliary diseases. *Carcino-embryonic proteins, Vol.II, Ed., F.G.Lehmann, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, 1979*
177. Kohn, J., P.C. Weaver: Serum-alpha-1-fetoprotein in hepatocellular Carcinom. *Lancet* II: 334-336, 1974
178. Kojiro, Kawano, Isomura, Nakashima: Distribution of albumin- and/or AFP-positive cells in hepatocellular carcinoma, *Lab. Invest.* 44:221-6, 1981
179. Kostich, N.D., C.D. Ingham: Detection of hepatitis B surface antigen by means of orcein staining of liver. *Amer. J. clin. Path.* 67, 20-30, 1977
180. Krugman S., Giles J.: Viral hepatitis: new light on an old disease. *J. Amer. med. Ass.* 212, 571, 1969
181. Krupey, J., P. Gold, S.O. Freedman: Physiochemical studies of the CEA of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 128, 387, 1968
182. Kubo, Y., K. Okuda, M. Hashimoto et al.: Antibody to hepatitis B core antigen in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 72:1217, 1977
183. Kubo, Y., K. Okuda, Y. Shimokawa et al.: Hepatitis B surface antigenemia in patients with hepatocellular carcinoma in relation to clinical course and a-feto--protein. *Gastroenterology* 72:1213, 1977
184. Kueppers, F.: Genetically Determined Difference in the Response of Alpha-1-Antitrypsin Levels in Human Serum to Typhoid Vaccine. *Hum. Genet.* 6, 207-214, 1968
185. Kueppers, F., R.J. Fallat: Alpha-1-Antitrypsin Deficiency: A Defect in Protein-Synthesis. *Clin. chim. Acta* 24, 401-403, 1969
186. Kueppers, F.: Alpha-1-Antitrypsin Deficiency: Physiology, Genetics, and Pathology. *Hum. Genet.* 11, 177-189, 1971
187. Kupsopoulou, K.: Bestimmung von freiem CEA und CEA-Immunkomplexen in Seren von Patienten mit Carcinomen des Gastrointestinaltraktes; *Diss.* 1978

188. Kuroczik, W.: Der Wert des CEA zur Nachuntersuchung beim operierten Rectumacarcinom; Diss. 1977
189. Kuroyanagi, Y.: Results in the treatment of hepatocellular carcinoma with special reference to alpha-fetoprotein. Gann. 14, 107, 1973
190. Lamerz, R., J. Grunst, A. Fateh-Moghadam, U. Schmalhorst, H. Pichlmaier, J. Eisenburg: Serum-Alpha-Fetoprotein-Veränderungen nach partieller Hepatektomie am Menschen. Klin. Wschr. 53, 129, 1975
191. Lamerz, R., A. Fateh-Moghadam: Carcinofetale Antigene. II. Carcinoembryonales Antigen (CEA). Klin. Wschr. 53, 193-203, 1975
192. Lamerz R., Fateh-Moghadam A.: Carcinofetale Antigene. I. Alpha-Fetoprotein. Klin. Wschr. 53, 147, 1975
193. Lamerz R., Schmalhorst U., Grunst J., Fateh-Moghadam A., Eisenburg J.: Bedeutung der Serum-Alpha-Fetoprotein-Bestimmung. Fortschr. Med 94:702, 1976
194. Lamerz R.: Nachweis fetaler Antigene: Praktische Bedeutung für Diagnose und Nachsorge bei Malignomen. Therpiewoche 28:4081, 1978
195. Laurell, C.B., S. Erikson: The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum α_1 -antitrypsin deficiency. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 15, 132, 1963
196. Laurence, D.J.R., U. Stevens, R. Bettelheim, D. Darcy, C. Leese, C. Turberville, P. Alexander, E.W. Johns, A. Munro-Neville: Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal, mammary and bronchial carcinoma. Br. Med. J. 3, 605-609, 1972
197. Lee, F.I.: Cirrhosis and hepatoma in alcoholics. Gut 7:77-85, 1966
198. Leek, A.E., C.F. Rouss, M.J. Kitau, T. Chard: Raised alpha-fetoprotein in maternal serum with anencephalic pregnancy. Lancet II, 385, 1973
199. Leek, A.E., T. Chard: Maternal alpha-fetoprotein and neural tube defects. Lancet I, 876, 1974
200. Lehmann, F.G.: Der Nachweis von Alpha-1-Foetoprotein bei internen Erkrankungen. Aktueller Stand des Problems. Internist (Berl.) 13, 332, 1972
201. Lehmann, F.G., D. Lehmann, G.A. Martini: Alpha-1-foetoprotein in liver diseases. Digestion (Basel) 6, 249, 1972
202. Lehmann: Epidemiologie und Diagnostik des primären Leberzellkarzinoms. Internist 4, 274, 1973

203. Lehmann F., Lehmann D., Martini G.: Alpha-1-Fötoprotein bei Lebererkrankungen. Z.Gastroent.11:385, 1973
204. Lehmann F., Lehmann D.: Vergleich verschiedener Methoden zum serologischen Nachweis von alpha-1-Foetoprotein im Serum. Z. klin. Chem. 11:339, 1973
205. Lehmann, F.G., D. Lehmann, A. Martini: Empfindlicher Nachweis von Alpha 1-Foetoprotein im Serum durch passive Hämagglutination. Kon. Wschr. 52, 216, 1974
206. Lehmann, G.F., D. Lehmann: Alpha 1-Foetoprotein in malignen Tumoren. Klin. Wschr. 52, 222, 1974
207. Lehmann, F.G.: Tumorantigene. Dtsch. med. Wschr. 99, 410, 1974
208. Lehmann F.G.: Alpha 1-Fetoprotein und Regan-Isoenzym im Serum bei malignen Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Z. Gastroenterol. 11:325, 1975
209. Lehmann, F.G.: Serologische Tumordiagnostik. Internist 16, 214, 1975
210. Lehmann: Das AFP in der Diagnose des Hepatoms und teratogener Tumoren; Med. Lab. 30, 87-89, 1977.
211. Lehmann, Wegener: In: F. G. Lehmann (Ed.) Carcino-Embryonic Proteins; Vol. I. Elsevier, Amsterdam p. 233, 1979 ..
212. Lieberman, J.: Heterozygous and homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with pulmonary emphysema. N. Engl. J. Med. 281, 279, 1969
213. Lieberman, J., C. Mittman, H.W. Gordon: Alpha, anti-trypsin in the livers of patients with emphysema. Science 175:63-65, 1972
214. Lieberman: Emphysema, cirrhosis and hepatoma with alpha-1-antitrypsin deficiency. Ann. Intern. Med. 81, 850, 1974
215. Lieberman, J., R.M. Siltan, C.M. Agliozzo, J. McMahon: Hepatocellular carcinoma and intermediate alpha-1-antitrypsin deficiency (MZ phenotype). Am. J. Clin. Pathol. 64:304-310, 1975
216. Lieberman, J.: Alpha-1-antitrypsin deficiency an chronic pulmonary disease. New York State J. Med. 76, 181, 1976
217. Lindner, E., M. Seppälä: Localization of the alpha-fetoprotein in the human fetus and placenta. Acta path. microbiol. scand. 73:565, 1968
218. Lo Gerfo, P., F. Herter: Demonstration of tumor associated antigen in normal colon and lung. J. surg. oncol. 4, 1, 1971
219. Lo Gerfo, P.L., F.P. Herter, J. Braun, H.J. Hauser: Tumor associated antigen with pulmonary neplasms. Ann. Surg. 175, 495, 1972

220. Lo Gerfo, P.L., F.P. Herter, S.J. Bennett: Absence of circulating antibodies to carcinoembryonic antigen in patients with gastrointestinal malignancies. *Int. J. Cancer* 9, 344, 1972
221. Lo Gerfo, P.L., F.P. Herter: Carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colon cancer. *Ann. Surg.* 181, 81, 1975
222. Mach, J.P., G. Pusztaszeri, M. Dysli, F. Kapp, B. Biersens de Haan, R.M. Loosli, P. Grob, H. Isliker: Dosage radioimmunologique de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) dans le plasma de malades atteints de carcinomes. Conclusions des premiers résultats d'une étude collaborative en Suisse. *Schweiz. med. Wschr.* 103, 365-371, 1973
223. McDonald: Primary carcinoma of the liver. *Arch. Int. Med.* 99, 266, 1957
224. MacNab, G.M., J.M. Urbanowicz, E.W. Geddes, M.C. Kew: Hepatitis B surface antigen and antibody in Bantu patients with primary hepatocellular cancer. *Br. J. Cancer* 33:544, 1976
225. MacNab G., Alexander J., Lecatsas G., Bey E., Urbanowicz J.: Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line. *Br. J. Cancer* 34:509, 1976
226. Manessis, E., S. Hadziyannis, G. Karcoutzis, G. Merikas: Epidemiological observations on primary liver cancer in Greece. *Proceedings of the Fourth Panhellenic Congress of Gastroenterology.* P. Paschalides, Athens, p 859, 1976
227. MacSwenn R.: A clinicopathological review of 100 cases of primary malignant tumours of the liver. *J. clin. Path.* 27:669, 1974
228. Makino, S., C.E. Reed: Distribution and Elimination of Exogenous Alpha-1-Antitrypsin. *J. Lab. clin. Med.* 75, 742-746, 1970
229. Martin, F., M.S. Martin: Demonstration of antigens related to colonic cancer in the human digestive system. *Int. J. Cancer* 6, 352-360, 1970
230. Masopust, J., L. Kotal: Fetoprotein: Immunochemical of an autonomous fetal compotent in sera from human fetuses. *Ann. paediat. (Basel)* 204:138, 1965
231. Masopust, J., K. Kithier, J. Radl, J. Koutecky, L. Kotal: Occurence of fetoprotein in patients with neoplasms and non-neoplastic diseases. *Int. J. Cancer* 3, 364, 1968
232. Masseyeff: Human-alpha-fetoprotein. *Path. et Biol.* 20, 703, 1972

233. Masseyeff R.: Factors influencing alpha-fetoprotein biosynthesis in patients with primary liver cancer and other diseases. Gann. Monogr. on Cancer Res.14:3, 1973
234. Maupas, P., P. Coursaget, A. Goudeau, J. Drucker, M. Sankale, J. Linhard, G. Diebolt: Annls. Microbiol. Inst. Pasteur 128A:245, 1977
235. Matsumoto, Suzuki, Asada, Ozawa, Tobe, Honjo: Clinical classification of hepatoma in japan according to serial changes in serum AFP-levels; Cancer 49:354-360, 1982
236. Mawas, C., M. Kohen, J. Lemerle, D. Buffe, O. Schweisguth, P. Burtin: Serum alpha 1-foetoprotein (fetuin) in children with malignant ovarian or testicular teratomas. Preliminary results. Int. J. Cancer 4, 76, 1969
237. Michaelis u.a.: Über das AFP in der Differentialdiagnostik des primären Leberkarzinoms; Immunität und Infektion 4, Nr. 5, 220-228, 1976
238. Miller, F., M. Kuschner: Alpha-1-antitrypsin deficiency, emphysema necrotizing angiitis and glomerulonephritis. Am. J. Med. 46, 615, 1969
239. Moore, T.L., H.Z. Kupchik, N. Marcon, N. Zamchek: Carcinoembryonic antigen assay in cancer of the colon and pancreas and other digestive tract disorders. Amer. J. Dis. 16, 1, 1971
240. Moore, T., P. Dhar, N. Zamchek, A. Keely, L. Gottlieb, H.Z. Kupchik: Carcino-embryonic antigen(s) in liver disease. I. Clinical and morphological studies. Gastroenterology 63, 88, 1972
241. Mori, W., R. Machinami, K. Tanaka: Pathology of hepatocellular carcinoma. Pathol. Res. Pract. 169:4-20, 1980
242. Morin, T., J.-P. Martin, G. Feldmann et al.: Heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency and cirrhosis in adults, a fortuitous association. Lancet 1, 250, 1975
243. Moroz, S.P., E. Cutz, D.W. Cox, A. Saas-Kortsak: Liver disease associated with alpha₁-antitrypsin deficiency in childhood. J. Pediatr. 88, 19, 1976
244. Morse, J.O.: Alpha-1-antitrypsin deficiency. N. Engl. J. Med. 229, 1045, 1978
245. Mostofi, Sobin: Histological typing of testis tumors. Int. Hist. Classif. Tumours, No 16. World Health Organization, Geneva 1977
246. Munoz, J.R., G. Guillen, F.P. Toribio: Alpha-fetoprotein in hepatomas, neoplasms, and other illnesses. Lancet I, 850, 1972
247. Murugasu, R.: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B. Histopathology 4:579, 1980

248. Nagell van, J.R., W.R. Meeker, J.C. Parker, J.D. Harralson: Carcinoembryonic antigen in patients with gynecologic malignancy. *Cancer* 35, 1372-1376, 1975
249. Nakashima, T., K. Okuda, K. Masamichi et al.: Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer* 51: 863-877, 1983
250. Nayak, N.C., A. Dhar, R. Sachdeva et al.: Association of human hepatocellular carcinoma and cirrhosis with hepatitis B virus surface and core antigens in the liver. *Inter. J. Cancer* 20:643, 1977
251. Nazarewicz, T., K. Krawczynski, J. Slusarczyk, A. Nowoslawski: Cellular localization of hepatitis B virus antigens in patients with hepatocellular carcinoma coexisting with liver cirrhosis. *J. Infect. Dis.* 135: 298, 1977
252. Neville, A.M., D.J. Laurence: Report of the workshop on the carcinoembryonic antigen (CEA) - the present position and proposals for future investigations. *Int. J. Cancer* 14, 1, 1974
253. Nielsen, J.O., P. Elling: Investigations of liver biopsies for Australia antigen by immunofluorescent technique. *Clin. exp. Immunol.* 9, 699, 1971
254. Nishi, S.: Isolation and characterization of a human fetal alpha-globulin from the sera of fetuses and a hepatoma patient. *Cancer Res.* 30, 2507, 1970
255. Nishioka, M., T. Iyata, K. Okita, T. Harada, T. Fujita: Localisation of alpha-fetoprotein in hepatoma tissues by immunofluorescence. *Cancer Res.* 32, 162, 1972
256. Nishioka, K.T., T. Hirayama, T. Sekine, K. Okochi, M. Mayumi, S. Juei-Low, L. Chen-Hui, L. Tongmin: Australia antigen and hepatocellular carcinoma. *Gann* 14:167, 1973
257. Nishioka, K., T. Iyata, K. Miyazato, K. Okita, K. Hironaga, T. Fujita: Immunofluorescence studies on alpha-fetoprotein in hepatoma tissue. *Gann* 14, 205, 1973
258. Norgaard-Pederson B., Dabelsteen E., Edeling G.: Localisation of human alpha-fetoprotein synthesis in hepatoblastoma cells by immunofluorescence and immunoperoxidase methods. *Acta pathol. microbiol. scand. Sect. A*, 82:169, 1974
259. Norgaard-Pedersen B.: Human alpha-fetoprotein. *Scand. J. Immunol. Suppl.* 4:1, 1976
260. Nowoslawski, A., W.J. Brzosko, K. Madalinski, K. Krawczynski: Cellular localization of Australia antigen in the liver of patients with lymphoproliferative disorders. *Lancet* I, 494, 1970

261. Nunez, E., F. Engelmann, G. Benassay, M.F. Jayle: Identification et purification préliminaire de la foeto-protéine liant les oestrogènes dans le sérum de rats nouveau-nés. C.R. Acad. Sci. (Paris) 273, 242, 1971
262. Nussbaum, K.: Bestimmung des CEA im Sputum von Brochialkarzinomträgern mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz; Diss. 1978
263. Ohaki, Y., M. Kazuaki, S. Yoshio, A. Tsunoda: Hepatitis B surface antigen positive hepatocellular carcinoma in children. Cancer 51:822, 1983
264. Ohbayashi, A., K. Okochi, M. Mayumi: Familial clustering of asymptomatic carriers of Australia antigen and patients with chronic liver disease of primary liver cancer. Gastroenterology 62:618-625, 1972
265. Ohnishi, K., I. Shinji, I. Shosuke, G. Nobuaki et al.: The effect of chronic habitual alcohol intake on the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: Relation to hepatitis B surface antigen carriage. Cancer 49:672-677, 1982
266. Ohta, X.: Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. In: Hepatocellular Carcinoma (Ed) Okuda, K. & Peters, R.L. pp. 73-81. New York: J. Wiley, 1976
267. Okochi, K., M. Mayumi, Y. Haguino, N. Saito: Evaluation of frequency of Australia-antigen in blood donors of Tokyo by means of immune adherence hemagglutination technique. Vox Sang (Basel) 19:332, 1970
268. Okochi K, Murakami S: Observations on Australia antigen in Japanese. Vox Sang (Basel) 15:374, 1968
269. Okuda, K.: Primary liver cancer in Japan, Cancer 45: 2663, 1980
270. Okuda, K., T. Nakashima, S. Kazuyoshi et al.: Hepatocellular carcinoma arising in noncirrhotic and highly cirrhotic livers: A comparative study of histopathology and frequency of hepatitis B markers. Cancer 49: 450, 1982
271. Omata, M., M. Ashcavai, C. Liew, R.L. Peters: Hepatocellular carcinoma in the USA, etiologic considerations: localization of hepatitis B antigens. Gastroenterology 76:279, 1979
272. Omata, M., M. Ashcavai, R.L. Peters: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus markers in europe and USA. Lancet 1:433, 1979
273. Ortmans, Selmaier, Wildhirt: Das primäre Leberkarzinom. Münch. Med. Wschr. 26, 1245, 1970
274. Osswald et al.: α_1 -Antitrypsinmangel im frühen Kindesalter; Leber, Magen, Darm 9, Nr. 5, 241, 1979

275. Owen, M.C., R.W. Carell: Alpha-1-antitrypsin: Molecular abnormality of S variant. *Br. Med. J.* 1, 130, 1976
276. Palmer, P.E., R.A. DeLellis, H.J. Wolfe: Immunohistochemistry of liver in alpha₁-antitrypsin-deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* 62:350-354, 1974
277. Palmer, P.E., H.J. Wolfe: Alpha-1-antitrypsin deposition in primary hepatic carcinomas. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 100, 233-236, 1976
278. Palmer, P.E., H. Safaai, H.J. Wolfe: Alpha₁-antitrypsin and alpha-fetoprotein: Protein markers in endodermal sinus (yolk sac) tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 65:575-582, 1976
279. Palmer, P.E., W.M. Christopherson, H.J. Wolfe: Alpha₁-antitrypsin, protein marker in oral contraceptive-associated hepatic tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 68: 736-739, 1977
280. Palmer, P.E., H.J. Wolfe: Alpha₁-antitrypsin and hepatocellular carcinoma. *IRCS Med. Sn. Aliment. Syst.* 5: 109, 1977
281. Palmer, P.E., H.J. Wolfe, Y. Dayal, D.L. Gang: Immunocytochemical diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Surg. Pathol.* 2:275-281, 1978
282. Palmer, P.E., H.J. Wolfe, C.I. Kostas: Multisystem fibrosis in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 1, 221, 1978
283. Palmer et al.: Expression of protein markers in malignant hepatoma: evidence for genetic and epigenetic mechanisms; *Cancer* 45, 1424, 1980
284. Pastore et al: Hepatitis B-virus markers, alpha-fetoprotein and survival in fulminant viral hepatitis. *J.Med.Virol.* 7:97,1981
285. Patton, Horn: Primary liver carcinoma. *Cancer* 17, 757, 1964
286. Pedersen, K.O.: Fetuin a new globulin isolated from serum. *Nature (Lond.)* 154, 575, 1944
287. Peers, F.G., C.A. Linsell: Dietary aflatoxins and liver cancer - a population based study in Kenya. *Br. J. Cancer* 27:473-484, 1973
288. Peters, R.L., M. Ashcavi, A. Redeker: Histological changes in the liver of HAA carriers with normal serum transaminase levels. *Hepatitis scientific Memoranda*, H 62:19, 1970
289. Peters, R.L.: Pathology of hepatocellular carcinoma. In: *Hepatocellular Carcinoma*, edited by K. Okuda and R.L. Peters, pp. 107-168. John Wiley, New York and Chichester, 1976

290. Peters, Afroudakis, Tatter: The changing incidence of association of hepatitis B with hepatocellular carcinoma in California. *Amer. J. clin. Path.* 68, 1, 1977
291. Peyrol et al.: Tissular immunoenzymatic detection of hepatic AFP in human hepatoms, *Digestion*, 18:351-70, 1978
292. Polterauer P., Horak W., Legenstein E., Müller M.: Hepatom-suspekte und -pathognomonische Serumkonzentrationen von Alpha-1-Fetoprotein. *Wien.Klin.Wschr.* 91, 1979
293. Polterauer, Horak: Das primäre Leberzellkarzinom, Ätiologie und Klinik. *Wien, klin. Wochenschr.* 91, 531-40, 1979
294. Polterauer, Horak, Legenstein, Müller: Hepatomsuspekte und -pathognomonische Serumspiegel von AFP. *Wien, klin. Wschr.* 1979
295. Porter, C.A., A.P. Mowat, P.J.L. Cook, D.W.G. Haynes, K.B. Shilkin, R. Williams: α_1 -antitrypsin deficiency and neonatal hepatitis. *Brit. med. J.* II: 435-439, 1972
296. Prince A.M.: An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Nat. Acad., Sci* 60:841, 1968
297. Prince, A.M., R.L. Hargrove, G.H. Jeffries: The role of serum hepatitis virus in chronic liver disease. *Trans. Ass. Amer. Phycns.* 82:265, 1969
298. Prince, A.M.: Role of serum hepatitis virus in chronic liver disease. *Gastroenterology* 60:913, 1971
299. Prince, A.M., W. Szmuness, J. Michon, J. Demaille, G. Diebolt, J. Linhard, C. Quenum, M. Sankale: *Int. J. Cancer* 16:376, 1975
300. Pugh: *Pathology of the Testis*, Oxford 1976
301. Purtilo, D.T., E.J. Yunis: Alpha-fetoprotein its immunofluorescent localization in human fetal liver and hepatoma. *Lab. Invest.* 25:291, 1971
302. Purves, L.R., I. Bersohn, E.W. Geddes: Serum alpha-fetoprotein and primary cancer of the liver in man. *Cancer (Philad.)* 25, 1261, 1970
303. Purves, van der Merwe, Bersohn L: Variants of alpha-fetoprotein. *Lancet* 2:464, 1971
304. Purves, L.R., W.R. Branch, E.W. Geddes, C. Manso, M. Portugal: Serum alpha-fetoprotein. VII. The range of apparent serum values in normal people, pregnant women, and primary liver cancer high risk populations. *Cancer (Philad.)* 31, 578, 1973

305. Purves, L.R., C. Manso, F.O. Torres: Serum alpha-feto-protein levels in people susceptible to primary cancer in southern Africa. *Gann.* 14, 51, 1973.
306. Pustaszeri, G., J.P. Mach: CEA in non-digestive cancerous and normal tissues. *Immunochemistry* 10, 193, 1973.
307. Rapp, W., H.E. Lehmann: Nachweis des Alpha₁-Fötoprotein in menschlichem Tumorascites und seine partielle Isolierung. *Clin. Chim. Acta* 31:45, 1971.
308. Ravry M., McIntire K., Moertel C., Waldmann T., Schutt A., Go V.: Carcinoembryonic antigen and alpha-fetoprotein in the diagnosis of gastric and colonic cancer. *J.Natl. Cancer Inst.* 52:1010, 1974
309. Reed, W.D., R.B. Stern, A.L. Eddleston, R. Williams: Detection of hepatitis-B antigen by radioimmunoassay in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Great Britain. *Lancet* II:690, 1973
310. Reintoft, I.: Alpha-1-Antitrypsin deficiency experience from an autopsy material. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (A)* 85, 649, 1977
311. Reintoft et al.: Demonstration of alpha₁-Antitrypsin in hepatomas; *Arch. Pathol. Lab. Med.* 103, 495, 1979
312. Richard, Ruibal, Monné, Vilaseca, Guardia: Carcino-embryonic antigen in liver disease, *Lancet* 1, 447-8, 1979
313. Rioche, M., S. Quelin, I. Aeck, M. Jacquesson, B. Basteris, R. Masseyeff: Culture in vitro de cellules de cancer primitif de foie humain. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 271:1148, 1970
314. Robinson, W.S., L.Y. Lutwick: The virus of hepatitis B. *New Engl. J. Med.* 295:1232, 1168, 1976
315. Rokitansky: Manual of pathological Anatomy 2, 151, 1849. (Translated by Sieveking) London: Edward.
316. Rauschdy, K.: Karzinoembryonaler Test; Diss. 1978
317. Rule, A.H., G.H. Goleski-Reilly, D.P. Sachar, J.P. Vandervorde, H.D. Janowitz: Circulating carcino-embryonic antigen (CEA). Relationship to clinical status of patients with inflammatory bowel diseases. *Gut* 14, 880, 1973
318. Ruoslahti, E., M. Seppälä: Studies of carcino-fetal proteins. III. Development of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein. Demonstration of alpha-fetoprotein in serum of healthy human adults. *Int. J. Cancer* 8, 374, 1971
319. Ruoslahti, E., M. Seppälä, H. Pihka, P. Vuopio: Studies of carcino-fetal proteins. II. Biochemical comparison of alpha-fetoprotein from human fetuses and patients with hepatocellular cancer. *Int. J. Cancer* 8, 283, 1971

320. Ruoslahti, E., M. Seppälä: Studies of carcino-fetal proteins: I. Physical and chemical properties of human alpha-fetoprotein. *Int. J. Cancer* 7, 218, 1971
321. Ruoslahti, E., M. Seppälä, P. Vuopio, E. Saksela, P. Peltoallio: Radioimmunoassay of alpha-fetoprotein in primary and secondary cancer of the liver. *J. nat. Cancer Inst.* 49, 623, 1972
322. Ruoslahti, E., M. Seppälä: Radioimmunoassay of maternal serum alpha-fetoprotein during pregnancy and delivery. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 112, 208, 1972
323. Ruoslahti, E., M. Seppälä, J.A. Räsänen, P. Vuopio, T. Helske: Alpha-fetoprotein and hepatitis B antigen in acute hepatitis and primary cancer of the liver. *Scand. J. Gastroent.* 8, 197, 1973
324. Ruoslahti, E., H. Pihko, F. Seppälä: Alpha-fetoprotein: Immunochemical purification and chemical properties. Expression in normal state and in malignant and nonmalignant liver disease. *Transplant. Rev.*, 20, 38-60, 1974
325. Ruoslahti E., Terry W.: a-foetoprotein an serum albumin show sequence homology. *Nature* Vol. 260:804, 1976
326. Sabourin: Contribution a l'etude des lesions du parenchym hepatique dans la cirrhose. Essai sur l'adenome du foie. Thesis No. 39, Paris 1881
327. Sakurai, M., T. Miyaji: Alpha-fetoprotein and the morphology of hepatoma in man. *Gann.* 14, 185, 1973
328. San Jose, Cady, West, Chomet, Zimmerman: Primary carcinoma of the liver. *Amer. J. Dig. Dis.* 10, 657, 1965
329. Sanwald R, Sauerbruch T, Lehmann E: Australia antigen in patients with acute and chronic liver disease in blood donors and recipients. *Vox-Sang* 19:412, 1970
330. Sanwald R., Sauerbruch T.: Australia (SH)-Antigen bei Blutspendern und Empfängern. *Dtsch.med.Wschr.* 95:2153, 1970
331. Sanwald, R., G. Diezel, K. Heilmann, W. Rapp, L. Tibor: Australia-Antigen-Träger. Klinische Befunde und Möglichkeiten der Übertragung. *Therapiewoche* 22, 49, 4417, 1972
332. Sasaki, K., A. Miyakawa, M. Mito, Y. Kasai: Histology of hepatoma in man with regard to alpha-fetoprotein. *Gann.* 14, 199, 1973
333. Sauerbruch, T.: Untersuchung zur klinischen Bedeutung des Australia-Antigen's. Diss. Heidelberg 1971
334. Seppälä, M., E. Ruoslahti: Alpha-fetoprotein in Rh-immunized pregnancies. *Obstet. and Gynec.* 42, 701, 1973
335. Shanmugaratnam: Liver cancer and cirrhosis in Singapore. *Acta Un. Int. Cancer* 17, 898, 1961

336. Sharp, Bridges, Krivit, Freier: Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: A previously unrecognized inherited disorder. *J. Lab. Clin. Med.* 73, 934, 1969
337. Sharp, H.L.: Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hosp. Pract.* 6, 83, 1971
338. Sharp, H., E. Freier: Familial cirrhosis; in: Mittmann Pulmonary emphysema and proteolysis, pp. 101-113 (Academic Press, New York 1972)
339. Sherlock: Diseases of the liver and biliary system. 4. Aufl., Oxford-Edinburgh: Blackwell, 1968
340. Sherlock, S., R.A. Fox, S.P. Niazi, P.J. Scheuer: Chronic liver disease and primary livercell cancer with hepatitis-associated (Australia) antigen in serum. *Lancet* 1:1243-1247, 1970
341. Sherlock, S.: The course of long incubation (Virus B) hepatitis. *Brit. med. Bull.* 28:109, 1972
342. Shikata, T., K. Sakakibara: Relationship between alpha-fetoprotein and histological patterns of hepatoma and localization of alpha-fetoprotein in hepatoma cells using the Peroxidase antibody technique. *Gann.* 14, 269, 1973
343. Shulman, N.R., R.J. Hirschau, L.F. Barker. Viral hepatitis. *Ann. intern. med.* 72:257, 1970
344. Silver, H.K.B., J. Deneault, P. Gold, W.G. Thompson, J. Shuster, S.O. Freedman: The detection of alpha-1-fetoprotein in patients with viral hepatitis. *Cancer Res.* 34, 244, 1974
345. Singleton, J.W., R.A. Fitch, Merrill, P.F. Kohler, W.A.H. Rettber: Liver disease in Australia-Antigen positive blood donors. *Lancet* 2:785, 1971
346. Skelly, J., J.A. Copeland, C.R. Howard, A.J. Juckerman: Hepatitis B surface antigen produced by a hepatoma cell line. *Nature* 282:617-8, 1979
347. Skinhoj, P., J.P.H. Hansens, F. Mikkelsen: Occurrence of cirrhosis and primary liver cancer in an Eskimo population hyperendemically infected with hepatitis B virus. *Am. J. Epidemiol.* 108:121, 1978
348. Smith, J.B., D. Todd: Foetoglobulin and primary cancer. *Lancet* 11:833, 1968
349. Smith J., Edington T., Williams A.: Immunofluorescent localisation of human alpha-fetoprotein in fetal and neonatal livers and cultured cells form hepatocellular carcinoma. *Brit.J.Cancer* 25:343, 1971

350. Smith, J.B.: Occurrence of alpha-fetoprotein in acute viral hepatitis. *Int. J. Cancer* 8, 421, 1971
351. Smith, J.A., T.I. Francis: Immunoepidemiological and in vitro studies on possible relationships between Australia antigen and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 32:1713, 1972
352. Sumithran, E., K. Prathap: HBsAg positive chronic liver disease associated with cirrhosis and hepatocellular carcinoma in the Senoi. *Cancer* 40:1618, 1977
353. Summers, J., A. O'Connell, P. Maupas, A. Coudeau, P. Coursaget, J. Drucker: Hepatitis B virus DNA in primary hepatocellular carcinoma tissue. *J. Med. Virol* 2: 207, 1978
354. Sutnick, A.I., L. Millman, W.I. London, B.S. Blumberg: The role of Australia antigen in viral hepatitis and other diseases. *Annu. Rev. Med.* 23:161, 1972
355. Sveger, T.: Liver disease in alpha-1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200 000 infants. *New Engl. J. Med.* 294, 1316, 1976
356. Sveger, T.: Alpha-1-antitrypsin deficiency in early childhood. *Pediatrics* 62, 22, 1978
357. Szmuness et al.: Prevalence of hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Chinese-Americans. *J. infect. Dis.* 137, 822, 1978
358. Szmuness: Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus. Evidence for a causal association. *Prog. med. Virol.* 24:40, 1978
359. Schleissner, L.A., A.H. Cohen: Alpha-1-antitrypsin deficiency and hepatic carcinoma. *Am. Rev. Resp. Dis.* 111:863-868, 1975
360. Schöne, G.: Untersuchungen über Karzinomimmunität bei Mäusen. *Münch. Wschr. Med.* 53, 2517-2519, 1906
361. Stannard, L.M., J. Alexander: Electron microscopy of HBsAg from human hepatoma cell line. *Lancet* 2:713-4, 1977
362. Sternberger, L.A., P.H. Hardy, J.J. Cuculis, H.G. Meyer: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18:315-333, 1970
363. Tabor, E., R.J. Gerety, C.L. Vogel, A.C. Boyley, P.P. Anthony, C.H. Chan, L.F. Barker: Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 58:1197, 1977

364. Takahashi, M., A. Kawaguchi, K. Kawamata, T. Yasuma: Alpha-fetoprotein by the immunofluorescent antibody technique in primary liver carcinoma and its histopathological basis. *Gann.* 14, 219, 1973.
365. Talerman A.: The incidence of yolk sac tumor (endodermal sinus tumor) elements in germ cell tumors of the testis in adults. *Cancer* 36:211, 1975
366. Talerman A., Haije W., Baggerman L.: Serum alphafetoprotein (AFP) in patients with germ cell tumors of the gonads and extragonadal sites. *Cancer* 46:380, 1980
367. Tan A.Y.O., C.H. Law, Y.S. Lee: Hepatitis B antigen in the liver cells in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathology* 9:57, 1977
368. Tappeiner, G. et al.: Vergleichende Untersuchungen über Auftreten und Lokalisation des carcinoembryonalen Antigens (CEA) und eines normalen perchlorsäureextrahierbaren Dickdarmschleimhautantigens (NC) in Carcinomen und Polypen des Dickdarms. *Virchows. Arch. Abt. A*, 360, 129-140, 1973
369. Tatarinov, Y.S.: Detection of embryospecific alpha-globulin in the blood sera of patients with primary liver cancer. *Vop. med. Khim.* 10, 90, 1964
370. Teilum G., Albrechtsen R., Norgaard-Pedersen B.: Immunofluorescent localization of alpha-fetoprotein synthesis in endodermal sinus tumor (yolk sac tumor). *Acta path. microbiol. Scand.* 82:586, 1974
371. Terry, Henkart, Colligan, Todd: Structural studies of the major glycoprotein in preparations with carcinoembryonic antigen activity. *J. Exp. Med.* 136, 200-206, 1972
372. Tevisan, A., G. Realdi, C. Losi et al.: Hepatitis B virus antigens in primary hepatic carcinoma: immunofluorescent techniques on fixed liver tissue. *J. of Clin. Path.* 31:1133, 1978
373. Theodoropoulos, G., A. Fertakis, A. Archimandritis, C. Kapordelis, B. Angelopoulos: Alpha-1-antitrypsin phenotypes in cirrhosis and hepatoma. *Acta Hepatogastroenterol. (Stuttg.)* 23, 114, 1976
374. Thomson, D.M.P., J. Krupey, S.O. Freedman, P. Gold: The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 64, 161, 1969
375. Thung et al.: Distribution of five antigens in hepatocellular carcinoma; *Lab. Invest.* 41, 101, 1979

376. Tong, M.J., S.C. Sun, B.T. Schaeffer, N.K. Chang, K.J. Lo, R.L. Peters: Hepatitis-associated antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Ann. Int. Med.* 75: 687-691, 1971
377. Tong, M.J., J.M. Weiner, M.W. Ashcavai, G.N. Vyas: Evidence for clustering of hepatitis B virus infection in families of patients with primary hepatocellular carcinoma. *Cancer* 44:2338, 1979
378. Totovic et al.: Diagnostischer Wert der Immunperoxidase-Technik beim angeborenen α_1 -Antitrypsinmangel; *Leber, Magen, Darm* 10, Nr. 2, 91, 1980
379. Trevisan, A., G. Realdi, C. Losi, V. Ninfo, M. Rugge, L. Rampinelli: Hepatitis B virus antigens in primary hepatic carcinoma: immunofluorescent technique on fixed liver tissue. *J. Clin. Pathol.* 31:1133, 1978
380. Trichopoulos, D., C. Tabor, R.J. Gerety, E. Xirouchaki, L. Sparros, N. Munoz, C.A. Linsell: Hepatitis B and primary hepatocellular carcinoma in European populations. *Lancet* 2:1217, 1978
381. Tsuchida, Y., S. Saito, M. Ishida, K. Ohmi, Y. Urano, Y. Endo, T. Oda: Yolk sac tumor (endodermal sinus tumor) and alpha-fetoprotein: a report of 3 cases. *Cancer (Philad.)* 32, 917, 1973
382. Turbitt, M.L., R.S. Patrick, R.B. Goudie, W.M. Buchanan: Incidence in south-west Scotland of hepatitis B surface antigen in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 30:1124, 1977
383. Uriel, J., N. Rubio, F. Loisillier: Localisation intracellulaire de l'alpha-foetoprotéin du foie de rat à l'aide d'estrogènes tritiés. *C.R. Acad. Sci. Ser. D (Paris)* 275:1941, 1972
384. Uriel, J., B. de Nechaud, M. Dupiers: Oestrogen-binding properties of rat, mouse and human fetospecific proteins. Demonstration by immunoautoradiographic methods. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46:1175, 1972
385. Uriel, J., B. de Nechaud: An outline of the physiopathology of rat alpha-fetoprotein. *Gann* 14, 35, 1973
386. Uriel, J., F. Loisillier, A.M. Szekeley, H. Bismuth: Autoradiographic localization of intracellular alpha-fetoprotein in primary liver cancer in man. *Biomed.* 21:21, 1974
387. Vilaseca, Ruibal, Monne, Bacardi, Guardia: AFP-levels in cirrhosis and cancer of the liver, *Br. Med. J.* 2, 1163, 1978
388. Vogel, C.L., P.P. Anthony, F. Sadikali, L.F. Barker: Hepatitis associated antigen and antibody in hepatocellular carcinoma. Results of continuing study. *J. nat. Cancer Inst.* 48:1583, 1972

389. Wald, N.J., D.J. Brock, J. Bonnar: Prenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly by maternal serum alpha-fetoprotein measurement. *Lancet* I, 765, 1974
390. Waldmann T.A., McIntire K.: Serum alpha-fetoprotein levels in patients with ataxia telangiectasia. *Lancet* 2:1112, 1972
391. Warnatz, H.: *Diagnostik* 9, 193, 1976
392. Weiss W., Dittrich H., Baumgartner G., Eder G., Hanak H., Hentschel E., Kahn P., Mastnak Ch., Urbanek A.: Klinisch-praktische Bedeutung der AFP-Bestimmung im Serum. *Inn.Med.* 2:359, 1975
393. Wellmann, Gerstmann: Virushepatitis-Infektion und Leberkarzinom. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 104, 927, 1979
394. WHO: International histological classification of tumors. No. 20. Histological typing of tumors of the liver, biliary tract and pancreas. WHO, Geneva 1978
395. Wogang, G.N.: Dietary factors and special epidemiological situations of liver cancer in Thailand and Africa. *Cancer Res.* 35:3499-3502, 1975
396. Wright, R.: Chronic hepatitis. *Brit. med. Bull.* 2:120, 1972
397. Wu, P.C.: Patterns of hepatitis B surface antigen. Localization in cells of hepatocellular carcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 103:165, 1979
398. Wu, P.C., K.C. Lam: Cytoplasmic hepatitis B surface antigen and the ground-glass appearance in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 71:229-234, 1979
399. Yunis, E.J., R.M. Agostini, R.H. Glew: Fine structural observations of the liver in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Pathol.* 82, 265, 1976
400. Zamchek, N., T.L. Moore, P. Dhar, P.H. Kupchik: Immunological diagnosis and prognosis of human digestive tract cancer: Carcinoembryonic antigens. *New Engl. J. Med.* 286, 83, 1972
401. Zamchek, N.: Carcino-embryonic antigen-A non-specific cell phase "marker". Use in digestive tract diseases (Abstr.). *Clin. Res.* 11, 724, 1973

Lebenslauf

Eva Härtel, geboren am 22.02.1950 in Weiden.

1956 - 1974	Grundschule Handelsschule Abendgymnasium München
1974 - 1976	sechs Semester politische Wissenschaft an der Hochschule für Politik der Ludwig- Maximilians-Universität München
1976	Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin
1978	Ärztliche Vorprüfung
1979	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1981	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1982	Beendigung des Medizinstudiums mit dem 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Approbation zur Ärztin

In respektvoller Erinnerung gedenke ich Herrn Prof.Dr.Aldenähr
(† 5.4.1981) für die Überlassung des Themas.

Besonders verbunden fühle ich mich Herrn Prof. Dr. Gross für
die Übernahme der Arbeit und für die großzügige und über-
schauende Anleitung.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Günther Jautzke für die intensive und
individuelle Betreuung, die ganz wesentlich zum Gelingen der
Arbeit beigetragen hat.

Frau Allert danke ich für die Anfertigung der histologischen
Präparate und für ihre liebenswürdige Unterstützung.

Für die Mühe und Geduld bei der Erstellung der Photographien
danke ich ganz besonders Herrn Oehring.

Eva Härtel

